Акционерное Общество «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»

На правах рукописи

# Софьянович Ольга Александровна

# Изучение генетических основ синтеза γ-глутамильных ди- и трипептидов в Saccharomyces cerevisiae на примере γ-глутамил-валина и γглутамил-валил-глицина

03.02.07 – Генетика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: кандидат биологических наук Серебряный Всеволод Александрович

Москва 2020

# Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ	4
1.1. Актуальность темы	4
1.2. Цели и задачи работы	5
1.3. Научная новизна и практическая ценность работы	6
1.4. Положения, выносимые на защиту	7
2. Обзор литературы	8
2.1. GSH и другие у-глутамильные соединения	8
2.1.1. Структура и биологическая роль GSH	8
2.1.2. γ-Глутамильные соединения отличные от GSH	9
2.1.3. Применение у-глутамильных соединений	. 10
2.1.4. Пути синтеза у-глутамильных соединений	. 12
2.1.4.1. Пути синтеза у-глутамильных соединений <i>in vitro</i>	. 12
2.1.4.2. Пути синтеза у-глутамильных соединений <i>in vivo</i>	. 15
2.1.5. у-Глутамильные соединения в качестве вкусовых модификаторов	16
2.2. Вкусо-ароматические соединения и у-глутамильные пептиды	
дрожжевого экстракта.	. 17
2.3. Гамма-глутамильный цикл.	. 19
2.4. Биосинтез GSH. Ферменты биосинтеза	. 22
2.4.1. γ-Глутамилцистеин лигаза	. 23
2.4.2. Глутатион синтетаза	. 26
2.4.3. у-Глутамилцистеин-глутатион синтетаза	. 28
2.5. Деградация GSH. Ферменты деградации GSH	. 28
2.5.1. у-Глутамилтрансфераза	. 30
2.5.2. Суперсемейство у-глутамилниклотрансфераз	.34
2.5.2.1. у-Глутамилшиклотрансфераза	. 36
2.5.2.2. Семейство ChaC белков: Cha1и Cha2. Их физиологическая роль	.37
2.5.3. Оксопролиназы	.40
2.5.4. Cvs-Glv пептилазы	.42
2.5.4.1. Цитозольные Cvs-Glv пептилазы. Металлопептилазы	
семейства М17 и М20А	42
2.5.4.2. Мембраносвязанные Cys-Gly металлопептилазы.	
Аминопептилаза N и мембранная липептилаза.	44
2.5.5 Альтернативный путь деградации GSH в <i>Scerevisiae</i>	
комплексом (Dug2p-Dug3p) <sub>2</sub>	45
2.6 Субстратная специфичность ферментов у-глутамильного шикла	48
2.6.1 Субстратная специфичность GCL	48
2.6.2 Субстратная специфичность GS	50
2.6.2. Субстратная специфи шость СБ	52
2.7. Особенности конструирования штаммов <i>Сегечізіде</i> лля пишевой	52
промышленности	53
3 Материалы и метолы	60
31 Спелы	60
3.2. Условия культивирования и пробополготовка пля анализа у-FVG	00
$\gamma$ -EV и VG пептилов	60
	00

3.3. Условия культивирования и определение концентрации GSH	62
3.4. Условия проведения ПЦР в реальном времени и измерения	
активности ферментов	62
3.5. Эксперименты с рекомбинантной ДНК	63
3.5.1. Конструирование плазмиды pKS-URA3-PADH1-LR	67
3.6. Штаммы, использованные в данной работе и их конструирование	70
4. Результаты и обсуждение	77
4.1. Разработка методического подхода для изучения синтеза γ-EVG.	
Создание генетического инструментария «self-cloning» для обеспечения	
конститутивной экспрессии генов в штаммах-продуцентах	77
4.1.1. Образование пептидов γ-EVG и γ-EV. Исследование пептидного	
состава дрожжевых экстрактов в условиях ферментации с добавлением	
предшественников	80
4.2. Идентификация ферментов, участвующих в синтезе γ-EVG из	
различных предшественников	82
4.2.1. Изучение пути образования ү-EVG из ү-EV	82
4.2.2. Идентификация ферментов, участвующих в синтезе γ-EVG из VG.	•
Факторы, влияющие на образование γ-EVG из VG	84
4.2.2.1. Влияние импорта VG на синтез γ-EVG	84
4.2.2.2. Влияние деградации VG на образование γ-EVG	86
4.2.2.3. Влияние GSH на синтез γ-EVG из VG	88
4.2.3. Исследование путей синтеза ү-ЕVG из VG	90
4.2.4. Идентификация ферментов участвующих в синтезе ү-EV	92
4.2.4.1. Синтез ү-ЕV ферментами деградации GSH	92
4.2.4.2. Образование γ-EV ферментами синтеза GSH	95
4.3. Синтез γ-EVG при усилении экспрессии генов биосинтеза GSH	97
4.4. Поиск импортера γ-EVG	99
Выводы 1	.01
Список сокращений 1	.02
Список цитируемой литературы 1	.04

# 1. ВВЕДЕНИЕ

#### 1.1. Актуальность темы

Глутатион (ү-глутамил-цистеинил-глицин, GSH) – одно из основных внутриклеточных низкомолекулярных тиолсодержащих соединений, эукариотических синтезирующихся почти во всех некоторых И прокариотических клетках. Этот трипептид является первым известным у-глутамильным соединением, которое было обнаружено в дрожжевом экстракте в конце 19 века. После открытия GSH было найдено И охарактеризовано множество других ү-глутамильных соединений. К у-глутамильным соединениям относят разнородную группу веществ, в которых остаток L-глутамата через у-карбоксильную группу присоединен к акцептору. Акцепторами могут быть аминокислоты, короткие пептиды и другие соединения. Накопление информации о существовании такого рода соединений происходило в 1940-1970 годах и, как оказалось, они широко представлены в живых организмах и спектр их химического состава довольно разнообразен. Например, в 1949 году из листьев чая был выделен теанин (у-глутамилэтиламид) (Sakato, 1949), содержание которого составляло 50% всех свободных аминокислот растения (Vuong et al., 2011). В 1956 году хрусталика была выделена офтальмовая ИЗ глаз телят кислота (γ-глутамил-α-амино-n-бутирилглицин), содержание которой доходило до 20 мг на 100 г хрусталика (Waley, 1956).

В настоящее время к γ-глутамильным соединениям появился особо высокий интерес в связи с их участием во вкусовой рецепции. Оказалось, что многогранность вкусового восприятия многих продуктов питания (лук, сыр, чеснок, бобовые, вино и т. д.) зависит от содержания в них γ-глутамильных соединений, в том числе и пептидов. Такие соединения были названы «кокуми», что на японском языке означает «очень вкусный» (Ueda et al, 1990). Более того, в 2010 году было показано, что агонистами кальцийчувствительного рецептора человека CaCR являются 46 γ-глутамильных пептидов. Скрининг таких пептидов показал, что γ-глутамил-валил-глицин (γ-EVG) является потенциально интересным усилителем вкуса с сенсорной активностью в 12,8 раз выше, чем у GSH (Ohsu et al, 2010).

В связи с этим, исследование путей образования γ-глутамильных пептидов, и, в частности, γ-EVG, представляется важной практической задачей. Использование *Saccharomyces cerevisiae* в качестве штаммапродуцента выглядит перспективно, так как известно, что экстракт этих дрожжей широко используется в качестве вкусовой добавки в пищевой промышленности (Lin et al, 2012). Таким образом, создание продуцентов новых и эффективных γ-глутамильных пептидов со свойствами «кокуми» открывает возможности с одной стороны разнообразить рацион при диетах с ограниченным набором продуктов питания, с другой – уменьшить количество жиров и соли без значительной потери вкусовых свойств пици.

К настоящему времени про пути синтеза γ-глутамильных пептидов известно немного, но, имеющиеся данные позволяют заключить, что эти соединения образуются в живых тканях часто как побочные продукты биосинтеза GSH или как продукты его деградации. Таким образом, помимо описанного выше практического значения, изучение биосинтеза γ-глутамильных пептидов позволяет получить новую информацию о свойствах ферментов, участвующих в метаболизме GSH.

#### 1.2. Цели и задачи работы

Целью настоящей работы являлось:

1. Создание инструментария для многократной замены промоторов целевых генов для получения штаммов *S. cerevisiae*, не содержащих чужеродной ДНК.

2. Определение путей образования γ-глутамильных пептидов в *S. cerevisiae* на примере дипептида γ-глутамил-валина (γ-EV) и трипептида γ-EVG.

5

Для достижения этих целей были поставлены следующие задачи:

- Создать генетический инструментарий для замены промоторов целевых генов в *S. cerevisiae*, основанный на комбинировании гомологической рекомбинации и системы селекции-контрселекции.
- Экспериментально подтвердить накопление γ-EVG и γ-EV в клетках *S. cerevisiae*.
- Определить пути биосинтеза γ-EVG и γ-EV и транспорта γ-EVG внутрь клеток у *S. cerevisiae*.
- Изучить возможности сверхсинтеза  $\gamma$ -EVG в *S. cerevisiae*.

#### 1.3. Научная новизна и практическая ценность работы

В настоящей работе создан генно-инженерный инструментарий, позволяющий проводить многократную замену промоторов целевых генов с получением штаммов *S. cerevisiae*, не содержащих чужеродной ДНК.

Результаты, полученные в данной работе, указывают на то, что синтез  $\gamma$ -EVG из различных предшественников может проходить в *S. cerevisiae* по двум механизмам: 1) синтетическому, в процессе которого задействованы ферменты синтеза GSH и 2)  $\gamma$ -глутамилтрансферазному, при переносе  $\gamma$ -глутамильной группы на валил-глицин (VG).

Продемонстрировано, что за синтез  $\gamma$ -EVG из  $\gamma$ -EV отвечает ген *GSH2*, кодирующий глутатионсинтетазу (Gsh2), а предшественник  $\gamma$ -EV может образовываться двумя путями. За реализацию первого пути отвечает ген *GSH1*, кодирующий  $\gamma$ -глутамил-цистеин лигазу (Gsh1). За синтез  $\gamma$ -EV по второму пути отвечают гены *DUG2* и *DUG3*, кодирующие комплекс белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>, и/или *ECM38*, кодирующий  $\gamma$ -глутамилтрансферазу (Ecm38), которые способны перенести  $\gamma$ -глутамильную группу на L-валин.

Получены данные, показывающие, что синтез γ-EVG из предшественника VG осуществляется в результате переноса γ-глутамильной группы комплексом белков (Dug2-Dug3).

Получены данные, показывающие, что GSH является донором γ-глутамильной группы при реализации γ-глутамилтрансферазного механизма образования γ-EV и γ-EVG. Показано, что сверхэкспрессия генов синтеза GSH, *GSH1* и *GSH2*, приводит к увеличению синтеза γ-EVG.

Установлено, что за деградацию VG отвечает ген *DUG1*, кодирующий белок Dug1, ранее аннотированный как дипептидаза, расщепляющая цистеинил-глицин (CG).

Показано, что за импорт γ-EVG отвечает ген *HGT1*, кодирующий транспортер олигопептидов и GSH в *S. cerevisiae*, Hgt1.

#### 1.4. Положения, выносимые на защиту

1. В данной работе создан генетический инструментарий, который позволяет конструировать штаммы *S. cerevisiae* с измененной экспрессией генов, не оставляя при этом в геноме чужеродной ДНК.

B S. cerevisiae γ-EVG может образовываться двумя путями:
посредством присоединения глицина к γ-EV Gsh2 и 2) в результате переноса γ-глутамильной группы GSH на VG комплексом (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>.

3. Дипептид γ-EV может образовываться двумя путями. При реализации первого пути, γ-глутамильная группа GSH может переноситься на L-валин комплексом белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> и/или Ecm38. Синтез γ-EV по второму пути способен осуществляться Gsh1 посредством соединения L-глутамата с L-валином.

4. За деградацию VG в *S. cerevisiae* отвечает ген *DUG1*, кодирующий фермент Dug1.

5. За импорт γ-EVG внутрь клетки отвечает ген *HGT1*, кодирующий транспортер GSH и олигопептидов, Hgt1.

# 2. Обзор литературы

#### 2.1. GSH и другие ү-глутамильные соединения

#### 2.1.1. Структура и биологическая роль GSH

GSH является самым распространенным тиольным трипептидом живых организмов, внутриклеточная концентрация которого варьирует в пределах от 1 до 10 мМ (Meister and Anderson, 1983, Meister, 1988).



Рисунок 1. Структура GSH

Присутствие у-глутамильной связи в GSH наделяет его высокой стабильностью и устойчивостью к большинству клеточных пептидаз. Цистеин с его высоко реактивной сульфгидрильной группой (-SH) и низкий окислительно-восстановительный потенциал (-240-250 mV) (Spector et al 2001) делают GSH мощной восстановительной системой, в которой трипептид существует в двух состояниях: восстановленном (GSH) и окисленном (GSSG). Соотношение восстановленной и окисленной форм GSH является важнейшим показателем окислительного стресса в клетке. Поэтому поддерживающая соотношение GSH:GSSG на строгая регуляция, оптимальном уровне, является критичным параметром для выживания клеток. Не удивительно, что дисбаланс GSH в клетках млекопитающих встречается при многих серьезных патологиях, таких как рак, ВИЧ, нейродегенеративные нарушения, фиброзный кистоз, а также при старении (Townsend et al, 2003).

Высокая внутриклеточная концентрация и широкое распределение GSH в живых организмах говорит о его важной биологической роли в природе. GSH является протектором от многих видов токсичных для клетки агентов, например, активных форм кислорода (Galiazzo et al, 1987, Sies, 1985, 1993, Izawa et al, 1985, Grant and Dawes, 1996, Jamieson, 1998, Carmel-Harel and Storz, 2000) и реактивных азотных соединений (пероксинитрит,  $N_2O_3$ ) (Luperchio et al, 1996, Petit et al, 1996). GSH принимает участие в регуляции экспрессии генов (Sen and Packer, 1996, Arrigo, 1999), клеточном делении (Pallardó et al, 2009) и апоптозе (Hall, 1999), является соединением, запасающим цистеин для нужд клетки (свободный цистеин даже в умеренных количествах токсичен для клеток) (Higashi et al 1977, Meister, 1988). GSH участвует в тиол-дисульфидном обмене (Larsson et al, 1983) и обезвреживании многих ксенобиотиков (Ketterer, 1982), восстанавливает рибонуклеотиды в дезокси-рибонуклеотиды (Holmgren, 1976), участвует в переносе аминокислот через мембраны клеток (Meister and Anderson, 1983), является ко-фактором ряда ферментов, например, глиоксалазы И формальдегид-дегидрогеназы (Inoue and Kimura, 1995, Koivusalo et al, 1989). GSH поддерживает в восстановленной, биологически активной, форме такие низкомолекулярные соединения как аскорбиновая кислота И альфа-токоферол (Meister 1992, 1994), а также участвует в метаболизме простагландинов (Cagen et al, 1979) и лейкотриенов (Orning et al, 1980).

#### 2.1.2. *ү*-Глутамильные соединения отличные от GSH

Накопление информации о распространении γ-глутамильных соединений отличных от GSH происходило в 1950-1970 годах и, как оказалось, такие соединения широко распределены в живых организмах и спектр их химического состава довольно разнообразен.

Теанин, L-γ-глутамильное производное этиламина, был описан в 1949 году, как превалирующий ароматический компонент листьев чая (Sakato, 1949). γ-Глутамил-S-метилцистеин – одно из первых γ-глутамильных

9

соединений, найденное в фасоли обыкновенной, причем содержание его в зрелых бобах и стручках составляет примерно 1/3 часть всех небелковых аминокислот (Morris and Thompson, 1958). В лимской фасоли, наряду с у-глутамил-S-метил-цистеином, были обнаружены еще два пептида – у-глутамил-S-метилцистеин сульфоксид и у-глутамил-лейцин (Rinderknecht et al. 1958). ү-Глутамильные дипептиды – L-ү-глутамил-L-лейцин И  $L-\gamma$ -глутамил-L-метионин – были найдены в репчатом луке (Virtanen and Matikkala, 1960). В S. cerevisiae были идентифицированы L-у-глутамил-Lглутамат и L-у-глутамил-L-глутамин при росте на среде с глутаматом в качестве источника азота (Jaspers et al, 1985). В конце 60-х годов было продемонстрировано наличие ү-глутамильных пептидов В тканях млекопитающих: из хрусталика глаза телят выделили офтальмовую кислоту (у-глутамиламинобутират) (Waley, 1956); из мозгов яванской и африканской мартышек выделили и идентифицировали множество у-глутамильных пептидов – с глутамином, глицином, аланином, валином, изолейцином, глутаматом, серином, а также аланил-глицином (Reichelt, 1970). Трипептид у-EVG оказался довольно распространенным соединением, найденным в соевом и рыбном соусах, пиве и других продуктах питания (Kuroda et al, 2012, 2013, Miyamura et al, 2014, 2015).

#### 2.1.3. Применение ү-глутамильных соединений

γ-Глутамильные соединения обладают рядом уникальных свойств, которые привлекательны для использования их в медицине. Например, γ-глутамилированные соединения имеют высокую растворимость в воде, что очень важно для внутривенного введения лекарств с низкой растворимостью (Suzuki et al, 2007). Из-за наличия γ-глутамильной связи, разрыв которой требует специфических ферментов с определенной локализацией, γ-глутамильные соединения довольно стабильны в кровеносном русле. Данное свойство может быть использовано для создания пролекарств, специфичных для органов и тканей, которые эффективно экспрессируют GGT. Например, у-глутамил-дерморфин обладает мощным обезболивающим эффектом (Misicka et al, 1996), а концентрация допамина значительно увеличивается не только в почках, но и в мозге при использовании у-L-глутамил-L-дигидроксифенилаланина, который рассматривался В качестве перспективного лекарства при лечении болезни Паркинсона (Ichinose et al, 1987). Некоторые физиологические эффекты *у*-глутамильных млекопитающих: ү-D-глутамил-аминометилсоединений описаны для фосфонат, γ-D-глутамил-глицин, γ-D-глутамил-таурин, *γ*-D-глутамилβ-аланин обладают антагонистическими свойствами на возбуждение нервной системы (Davies et al, 1982). у-D-глутамил-L-триптофан стимулирует дифференциацию Т-лимфоцитов и специфический иммунный ответ, а также усиливает продукцию интерлейкина 2 и γ-интерферона (Orellana, 2002). В клинических исследованиях было показано увеличение эффективности сочетания химиотерапии и приема у-D-глутамил-L-триптофана при лечении туберкулеза (Simbirtsev et al, 2003). Теанин (ү-глутамил-этиламид), придающий сладковатый привкус зеленому чаю, снижает артериальное 1995), давление крови (Yokogoshi et al, способствует образованию расслабляющих α-волн в мозге (Kobayashi et al, 1998), влияет на уровень некоторых биоактивных соединений мозга (Kimura and Murata, 1986, et al. 1998). ү-L-глутамил-таурин имеет широкий Yokogoshi спектр фармакологического действия на живые организмы. у-L-глутамил-таурин является тормозным нейромодулятором (Kuribara and Tadokoro, 1982, Bittner et al. 2005). обладает радиопротекторным, антиоксидантным И мембраностабилизирующим действием (Bittner et al, 2005), проявляет кардиопротекторные (Feuer and S-Rozsa, 1981), антиаритмические и нормотензивные свойства (Feuer and Gaal, 1979, Bittner et al, 2005), влияет на метаморфоз амфибий (Feuer et al, 1978).

#### 2.1.4. Пути синтеза ү-глутамильных соединений

Существует множество ферментов, участвующих в образовании разнообразных у-глутамильных пептидов. Например, у-глутамил-гистамин синтетаза соединяет L-глутамат с гистамином in vitro с образованием у-глутамил-гистамина, который, по предположению авторов, является продуктом инактивации гистамина В центральной нервной системе заднежаберных (Stein and Weinreich, 1982). моллюсков аплизия В метилотрофах, таких как Pseudomonas MS и Methylocella silvestris, у-глутамил-метиламид синтетаза при росте культур на метиламине в качестве источника углерода участвует в его метаболизме с образованием у-глутамилметиламида (Kung and Wagner, 1969, Levitch, 1977, Chen et al, 2010). Рассмотрим некоторые пути синтеза у-глутамильных соединений *in vitro* и *in vivo* более подробно.

#### 2.1.4.1. Пути синтеза ү-глутамильных соединений in vitro

Стандартным способом получения γ-глутамильных соединений считается ферментативная реакция с использованием глутамина в качестве донора γ-глутамильной группы и соответствующего акцептора с помощью бактериальной γ-глутамилтрансферазы. Обычно выход продукта зависит от рН реакции, концентрации и соотношения γ-глутамильный донор/акцептор и концентрации GGT, поэтому условия реакции подбирают индивидуально для каждого γ-глутамильного соединения. Оптимальные условия реакций и выход продукта показаны в Таблице 1 (Suzuki et al, 2007).

**Таблица 1** – Оптимальные условия реакций и выход различных у-глутамильных соединений (по Suzuki et al, 2007)

ү-Глутамильное	Концентрации				Выход продукта	
соединение	L-глутамин	Акцептор	GGT	pН	%	г/Л
	мМ	мМ	mU/мл			
ү-L-глутамил-L-	200	200	250	10.6	79	51.5
дигидрокси-						
фенилаланин						
ү-L-глутамил-L-	300	300	200	9.7	48	41.2
гистидин						
ү-L-глутамил-L-	300	300	200	7.3	37	35.7
тирозин						
метилэфир						
γ-L-глутамил-L-	200	200	500	10.4	70	41.2
фенилаланин						
ү-L-глутамил-L-	20	300	40	10.0	88 <sup>a</sup>	4.3
валин						
S-бензил-GSH	200	100	200	6.2	76 <sup>6</sup>	31.2
моноэтилэфир						
ү-L-глутамил-	200	1500	400	10.0	61 <sup>a</sup>	21.1
этиламид						
ү-L-глутамил-таурин	200	200	200	10.0	25	12.7
ү-D-глутамил-	200	1500	400	10.0	74 <sup>a</sup>	25.6
этиламид						
γ-D-глутамил-таурин	200	200	200	10.0	71	36.1
γ-D-глутамил-L-	50	50	200	9.0	66	11.0
триптофан						

<sup>а</sup> Выход продукта по отношению к L-глутамину

<sup>6</sup> Выход продукта по отношению к акцептору ү-глутамильной группы

Еще одним способом получения γ-глутамильных соединений является ферментативная реакция, осуществляемая γ-глутамилцистеин синтазой. Возможность использования высокоочищенной GCS *Proteus mirabilis* была показана при получении γ-глутамильных пептидов с L-α-аминобутиратом, L-серином, L-гомосерином, глицином, L-аланином, L-норвалином, L-лизином, L-треонином, L-валином и таурином с достаточно высоким выходом. Выход продуктов ферментативных реакций сведен в Таблице 2 (Nakayama et al, 1981). **Таблица 2** – Выход продукта посчитан из расчета потребления L-глутамата и выражен относительно начальной концентрации L-глутамата (100%) (по Nakayama et al, 1981)

Высокоэффективное		Низкоэффективное		
образование		образование		
Субстрат	Выход (%)	Субстрат	Выход (%)	
L-цистеин	55.5	L-аспартат	17.4	
L-α-аминобутират	80.5	L-гистидин	17.3	
L-серин	72.5	L-фенилаланин	15.8	
L-гомосерин	68.5	L-тирозин	14.8	
глицин	62.5	L-триптофан	13.7	
L-аланин	56.3	L-аргинин	13.6	
DL-норвалин	43.5	L-лейцин	13.1	
L-лизин	38.1	L-канаванин	12.5	
L-треонин	37.1	DL-норлейцин	11.0	
L-изолейцин	37.1	L-метионин	10.5	
DL-гомоцистеин	36.1	L-орнитин	10.2	
таурин	24.5	L-цитруллин	0	
L-валин	24	L-глутамат	0	
L-аспарагин	23.3	L-глутамин	0	

При получении теанина (ү-глутамилэтиламида) успешно была применена система, в которой дрожжевая биомасса использовалась в качестве регенерирующей системы АТФ при совместном ферментировании ү-глутамилметиламид Methylovorus N⁰ 9. синтетазы штамма mays Оптимальная реакционная смесь содержала 300 мМ глюкозы, 600 мМ глутамата натрия, 600 мМ этиламида-HCl, 200 мМ фосфатного буфера и 30 единиц/мл фермента. Приблизительно 600 мМ теанина (110мг/мл) образовывалось в течение 48 часов с конверсией субстратов, глутамата и этиламида, 100% и таким же выходом теанина по отношению к глюкозе (Yamamoto et al, 2008). В более ранней работе, с помощью такой же системы, только с использованием глутаминсинтетазы Pseudomonas taetrolens Y30, было получено 170 мМ теанина с 28% выходом по глюкозе. В данном случае оптимальная реакционная смесь содержала 300 мМ глюкозы, 200 мМ глутамата натрия, 1200 мМ этиламида-HCl, 50 мМ фосфатного буфера, 5 мМ MnCl<sub>2</sub> и 100 единиц/мл фермента (Yamamoto et al, 2005).

#### 2.1.4.2. Пути синтеза ү-глутамильных соединений in vivo

Путресцин относится К полиаминам, являющимися высокореактивными молекулами, играющими важную роль в росте и пролиферации клеток (Xaplanteri et al, 2005). Накопление полиаминов может привести к замедлению синтеза белков и роста клеток (Fukuchi et al, 1995), поэтому пути их деградации строго регулируются. В *E.coli* одним из способов утилизации путресцина является его ү-глутамилирование ү-глутамил-путресцин синтазой PuuA, через у-глутамилирование считается более причем, путь предпочтительным, т.к. не ведет к спонтанной циклизации пятичленного промежуточного продукта γ-аминобутиральдегида. Более того, у-глутамилирование путресцина абсолютно необходимо при его утилизации в качестве источника азота и углерода (Kurihara et al, 2005, 2008).

Офтальмовая кислота, найденная в довольно высоких концентрациях (20мг/100гр) в хрусталике глаза телят (Waley, 1956), является аналогом GSH, в котором цистеин во втором положении заменен на L-α-аминобутират. Известно, что офтальмовая кислота синтезируется ферментами биосинтеза GSH – ү-глутамилцистеин синтетазой и глутатион синтетазой (Cliffe and Waley, 1958, Orlowski and Wilk, 1978). Было показано, что при экспозиции мышей гепатотоксичными концентрациями ацетаминофена, происходила активация биосинтеза офтальмата из α-аминобутирата. При этом изменения уровня офтальмовой кислоты в сыворотке крови и экстрактах печени мышей коррелировали: концентрация офтальмата сыворотки тесно крови значительно повышалась с одновременным снижением концентрации GSH печени. Физиологическая роль офтальмовой кислоты не установлена. Считается, что она синтезируется как побочный продукт синтеза GSH при снижении концентрации GSH и/или цистеина (Soga et al, 2006).

ү-Глутамилэтиламид (теанин) распространенный широко \_ у-глутамильный дипептид чая, придающий ему характерный аромат и вкус. Концентрация теанина в высушенных листьях чая варьирует в пределах 10-30 г/кг сухого веса (Wan et al, 2009). Предполагается, что основной причиной синтеза ү-глутамил-этиламида в чае является утилизация избыточного аммония, абсорбированного корешками растения (Deng et al, 2009). Теанин синтезируется из глутамата и метаболита чая этиламина с помощью теанин синтаз TS1 и TS2. Экспрессия генов TS1 и TS2 происходит во всех частях растения – корешках, побегах, семядолях и зрелых листьях, но уровень транскрипции в семядолях оказался значительно ниже, чем в других органах чая. Гены TS1 и TS2 имеют высокую нуклеотидную гомологию с нуклеотидными последовательностями генов глутаминсинтаз GS1 и GS3. TS1 на 99% гомологична GS3, TS2 на 97% гомологична GS1, между собой *TS1* и *TS2* гомологичны на 83% (Deng et al, 2008).

#### 2.1.5. у-Глутамильные соединения в качестве вкусовых модификаторов

В последнее время к  $\gamma$ -глутамильным пептидам появился высокий интерес в свете их участия во вкусовой рецепции. Многие  $\gamma$ -глутамильные пептиды относят к так называемым «кокуми»-пептидам, которые сами по себе не имеют вкуса и запаха, но усиливают получаемые ощущения от продуктов питания, придавая им ощущение полноты вкуса и длительность послевкусия. Во многих работах было показано, что  $\gamma$ -глутамильные пептиды усиливают насыщенность основных вкусов, таких как сладость и соленость, а также вкусовые восприятия (вкус «умами»), которые вызывают глутамат и 5'-рибонуклеотиды (Ueda et al, 1990, Liu et al, 2015).

Понятие о веществах со свойствами «кокуми» впервые ввел Ueda со своей группой. Они изолировали и исследовали ключевые соединения водного раствора чеснока, которыми оказались серосодержащие вещества – такие как S-аллил-цистеин сульфоксид, S-метил-цистеин сульфоксид, γ-глутамил-аллил-цистеин, GSH. Авторы пришли к выводу, что именно эти

соединения, добавленные к раствору глутамата и разным видам продуктов питания, могут существенно усиливать восприятие вкусовой насыщенности еды (Ueda et al, 1990).

Более того, был проведен скрининг библиотеки ди- и трипептидов и показана активность человеческого кальций-чувствительного рецептора CaSR к 46 ү-глутамильным пептидам. Самым эффективным агонистом возбуждения CaSR оказался трипептид γ-EVG, который показал минимальную концентрацию необходимую для детектирования активации рецептора в данном эксперименте (Ohsu et al, 2010).

Присутствие γ-глутамильных «кокуми»-пептидов, которые вызывают вкусовую привлекательность таких продуктов как сыр и фасоль, показали в своих обзорах Toelstede с соавторами и Dunkel с соавторами. Ключевыми вкусовыми модификаторами фасоли являются γ-EV, γ-глутамил-лейцин, γ-глутамил-цистеинил-β-аланин (Dunkel et al, 2007), а за сложность вкусового букета зрелого сыра «Гауда» отвечают такие γ-глутамильные дипептиды как γ-глутамил-глутамат, γ-глутамил-глицин, γ-глутамиль метионин, γ-глутамилгистидин, γ-глутамил-лейцин и γ-глутамил-глутамин (Toelstede et al, 2009).

# 2.2. Вкусо-ароматические соединения и у-глутамильные пептиды дрожжевого экстракта

Концентрат водорастворимой фракции дрожжей (дрожжевой экстракт) традиционно используется в качестве вкусовой добавки, обладающей мясным ароматом, в пищевой промышленности при изготовлении супов, снэков и т.д. (Lin et al, 2012). Помимо своего пикантного вкуса, дрожжевой экстракт является богатым источником аминокислот, пептидов, сахаров, нуклеотидов и витаминов группы В (Chae et al, 2001).

В последние десятилетия было проведено много исследований по идентификации состава активных вкусо-ароматических соединений в дрожжевом экстракте. Соединения со свойствами «умами», такие как глутамат, аспарагин, сукцинат, а также инозин 5'-монофосфат, гуанозин5'-монофосфат были широко представлены в дрожжах (Nagodawithana, 1992, 1994, Velisek et al, 1978).

В дрожжевом экстракте было показано высокое содержание GSH и в настоящее время основными его промышленными продуцентами являются штаммы *S. cerevisiae* и *Candida utilis* (Li et al, 2004). GSH считают основным источником мясного вкуса дрожжевого экстракта. При нагревании водных растворов, содержащих GSH, образуются мясные вкусо-ароматические компоненты, такие как фурантиолы, тиолы и пиразины. Ароматические свойства GSH в сырой и приготовленной еде были подробно исследованы, а также было показано, что он обладает свойствами «кокуми» (Ueda et al, 1997).

До недавнего времени GSH считался единственным γ-глутамильным «кокуми»-активным соединением клеток дрожжей. Только в 2015 году Liu с группой провел фракционирование вкусовых соединений дрожжевого экстракта с использованием молекулярно-сенсорного подхода.

Структура «кокуми»-компонентов дрожжевого экстракта с вкусовым ответом анализировалась максимальным с помощью LC-Q-TOF-MS/MS (квадраупольная, времяпролетная масс-спектрометрия сопряженная с ВЭЖХ). В данной работе исследовались 13 пептидов с предполагаемыми «кокуми»-свойствами. Вкусовые свойства и пороговые концентрации пептидов определялись специалистами. Вкусовые качества исследуемых пептидов дрожжевого экстракта представлены в Таблице 3, из которой видно, что за исключением γ-Glu-Cys-Gly с его кислым вкусом и безвкусных Ala-Val и у-Glu-Val, остальные пептиды показали горький вкус с пороговой концентрацией от 1,2 до 0,8 ммол л<sup>-1</sup> в воде (Liu et al, 2015), что согласуется с концепцией, что «умами»- и «кокуми»-пептиды, растворенные в воде, вызывают либо горький вкус, либо безвкусны (van den Oord and van Wassenaar, 1997).

**Таблица 3** – Вкусовые свойства и вкусовой порог предполагаемых «кокуми» пептидов в воде и курином бульоне (бланк) (по Liu et al, 2015)

	Вкусовые свойства 5 г/л <sup>-1</sup>		Вкусовой порог мМол/л <sup>-1</sup>	
Пептид	Вода	Куриный бульон	Вода	Куриный бульон
Ala-Val	безвкусный	нет эффекта	>26,4	>26,4
Leu-Lys	горький	горечь, «кокуми» ощущение	2,4	1,2
γ-Glu-Cys-Gly	кислый	«кокуми» ощущение	4,1	1
Leu-Gly	горький	горечь, «кокуми» ощущение	1,2	0,6
Leu-Ala	горький	горечь, «кокуми» ощущение	3,1	0,4
Ala-Glu	горький	горечь, «кокуми» ощущение	2,4	0,3
Tyr-Glu	горький	горечь, нет «кокуми»	8	>16,1
		ощущения		
γ-Glu-Leu	горький	горечь, «кокуми» ощущение	4,8	0,6
γ-Glu-Val	безвкусный	«кокуми» ощущение	>20,2	0,6
Leu-Thr	горький	горечь, «кокуми» ощущение	1,3	0,7
Ala-Tyr	горький	горечь, нет «кокуми»	4,9	>19,8
		ощущения		
Ala-Leu	горький	горечь, «кокуми» ощущение	6,2	1,5
γ-Glu-Tyr	горький	горечь, «кокуми» ощущение	4	1

Сенсорная оценка подтвердила, что 10 из 13 пептидов дрожжевого экстракта способны усиливать ощущение «кокуми» куриного бульона (бланка). Порог концентраций «кокуми»-пептидов для вкусового восприятия в бланке был значительно ниже, чем порог концентраций для горького вкуса в воде (Liu et al, 2015). Подобный феномен наблюдался для γ-глутамильных пептидов фасоли обыкновенной (Dunkel et al, 2007).

#### 2.3. Гамма-глутамильный цикл

Из сказанного выше видно, что многие γ-глутамильные соединения образуются ферментами метаболизма GSH. У высших млекопитающих процессы синтеза и деградации GSH замыкаются в гамма-глутамильный цикл. Этот цикл, первоначально предложенный Alton Meister в 1970, рассматривали в качестве глутатионзависимой транспортной системы аминокислот, таких как L-цистеин, L-глутамин и L-метионин, через мембраны (Orlowski and Meister, 1970). Также существовало предположение,

что в γ-глутамильном цикле не просто происходит транспорт аминокислот через мембраны, а генерируются внеклеточные сигналы в виде γ-глутамильных аминокислот, которые поступают внутрь клетки, где от них отщепляется глутамат с образованием 5-оксопролина, который, в свою очередь, активирует поглощение и/или метаболизм аминокислот (Vina et al, 1989).

Впоследствии оказалось, что γ-глутамильный цикл не вовлечен в транспорт аминокислот в значительной мере (Curthoys and Hughey, 1978, Woodlock et al, 1990), а связан в большей степени с внутриклеточным биосинтезом GSH, его транспортом во внеклеточную среду, деградацию до составляющих его аминокислот. Проведенные исследования позволили сформулировать последовательность этапов метаболизма GSH, которые впоследствии были включены в учебные пособия (Bachhawat and Kaur, 2017).

Лучше всего γ-глутамильный цикл изучен у млекопитающих, где показано наличие шести ключевых ферментов цикла: 2 фермента синтеза и 4 фермента деградации GSH (Meister and Anderson, 1983).

Биосинтетическая часть γ-глутамильного цикла включает две реакции. В первой реакции γ-глутамилцистеинлигаза (GCL) соединяет L-глутамат и L-цистеин с образованием γ-глутамилцистеина (Orlowski and Meister, 1971), во второй – глутатионсинтетаза (GS) катализирует присоединение глицина к γ-глутамилцистеину с образованием GSH (Snoke, 1955).

Деградативная часть у-глутамильного цикла состоит из реакций, которые осуществляют у-глутамилтрансфераза (GGT), ү-глутамилциклотрансфераза (GGC), 5-оксопролиназа и дипептидаза. Деградация GSH инициируется ферментативной активностью GGT, расположенной y млекопитающих в плазматической мембране активным центром наружу. В результате трансферазной реакции происходит разрыв у-глутамильной связи с переносом у-глутамильного остатка на любые аминокислоты или гидролиз ү-глутамильной образованием глутамата. После связи с переноса цистеинилглицина, образовавшегося в процессе разложения GSH, внутрь клетки происходит его гидролиз Cys-Gly пептидазой до свободных аминокислот.  $\gamma$ -Глутамильные аминокислоты, глутамат, цистеин и глицин импортируются обратно в цитоплазму, где вновь синтезируется GSH.  $\gamma$ -Глутамильные аминокислоты в цитоплазме являются субстратом  $\gamma$ -глутамил-циклотрансферазы, в результате активности которой образуется 5-оксопролин и свободные аминокислоты. 5-Оксопролиназа катализирует АТФ-зависимое превращение 5-оксопролина в глутамат (Meister and Tate, 1976, Meister and Anderson, 1983, Wang and Ballatori, 1998).

В настоящее время накоплено достаточно данных, касающихся γ-глутамильного цикла и, видимо, он функционирует не одинаково во всех живых системах, поскольку в некоторых организмах отдельные ферменты цикла не найдены (Bachhawat and Kaur, 2017).

Цикл GSH с известными в настоящее время ферментами и их локализацией в клетках млекопитающих и дрожжей представлен на Рисунках 2 и 3 по Bachhawat and Kaur, 2017.



Рисунок 2 – Цикл GSH в клетках млекопитающих. Ферменты, участвующие в метаболизме GSH: 1) γ-глутамилцистеинлигаза, 2) глутатионсинтаза, 3) Cha1 и Cha2 (описание ферментов в разделе 2.3.2.2), 4) 5-оксопролиназа, 5) Cys-Gly пептидаза, 6) γ-глутамилтрансфераза, 7) GSH-S-трансфераза, 8) дегидроаскорбат редуктаза, глутатионпероксидаза,

9) GSH редуктаза, 10) мембраносвязанная Cys-Gly пептидаза (из Bachhawat and Kaur, 2017)



Рисунок 3 – Цикл GSH в дрожжевых клетках. Ферменты, участвующие в метаболизме GSH: 1) ү-глутамилцистеинлигаза, 2) глутатионсинтаза, 3) ү-глутамилциклотрансфераза, 4) 5-оксопролиназа, 5) Суs-Gly пептидаза, 6) ү-глутамилтрансфераза, 7) глутатион-S-трансфераза, 8) дегидроаскорбат редуктаза, глутатионпероксидаза, 9) глутатионредуктаза (из Bachhawat and Kaur, 2017)

Далее мы рассмотрим особенности ферментов биосинтеза и деградации GSH, регуляцию их синтеза и активности, субстратную специфичность и физиологическую роль.

# 2.4. Биосинтез GSH. Ферменты биосинтеза

У большинства организмов GSH синтезируется в двух последовательных АТФ-зависимых реакциях с помощью ферментов – γ-глутамилцистеин лигазы (GCL) и глутатионсинтетазы (GS) (Рисунок 4).



Рисунок 4 – Синтез GSH

#### 2.4.1. ү-Глутамилцистеин лигаза

Первая биосинтеза GSH происходит реакция результате В АТФ-зависимого присоединения глутамата и цистеина ү-глутамилцистеин лигазой. Образование L-ү-глутамилцистеина происходит через интермедиата γ-глутамилфосфата, формирование который далее подвергается нуклеофильной атаке α-аминогруппой цистеина. Эта реакция является лимитирующей скорость синтеза GSH (Griffith and Mulcahy, 1999, Orlowski and Meister, 1971).

По гомологии нуклеотидных последовательностей GCL была распределена на три группы: γ-протобактерии (1 группа, нуклеотидная гомология 24-93%); эукариоты, кроме растений (2 группа, нуклеотидная гомология 32-98%); α-протобактерии и растения (3 группа, нуклеотидная гомология 45-93%). Несмотря на низкую гомологию нуклеотидных последовательностей между группами все GSL используют один и тот же механизм катализа (Copley and Dhillon, 2002).

Белок GCL был выделен и охарактеризован в некоторых грамотрицательных прокариотах и многих эукариотах, включая млекопитающих, растения, дрожжи и протозойных.

Фермент GCL человека и крысы представляет собой гетеродимерный состоящий каталитической субъединицы (GCLC) комплекс. ИЗ с молекулярной массой 73 кДа и модифицирующей субъединицы (GCLM) с молекулярной массой 31 кДа. GCLC содержит активный сайт, ответственный за АТФ-зависимое образование связи между аминогруппой цистеина и группой у-карбоксильной глутамата, И ингибируется GSH: GCLM посредством прямого взаимодействия с GCLC увеличивает каталитическую эффективность последней. GCLM снижает К<sub>м</sub> для глутамата и АТФ и увеличивает K<sub>i</sub> для GSH (Soltaninassab et al, 2000, Yang et al, 2007, Huang et al, 1993). Субъединицы GCL являются продуктами двух эволюционно неродственных генов и локализованы на разных хромосомах (Griffith and Mulcahy, 1999, Anderson, 1998, Tsuchiya et al, 1995).

Грибы и большинство глутатионсинтезирующих грамотрицательных бактерий не имеют функциональной регуляторной субъединицы GCL. Белок GCL *E.coli* является мономером с молекулярной массой 58 кДа (Griffith and Mulcahy, 1999). Причем интересным фактом является то, что GCL *E.coli* имеет более высокий уровень аминокислотной гомологии с GCLM, чем GCLC (Huang et al, 1993). Белок GCL *S. cerevisiae* по аминокислотному составу близок к GCLC крысы (45%) и имеет низкую гомологию (26%) к GCL *E.coli* (Ohtake and Yabuuchi, 1991).

В растениях GCL находится в обратимой мономер-гомодимерной форме (Gromes et al, 2008). Гомодимеризация является частью адаптивного ответа на изменение редокс-потенциала окружающей среды и происходит в результате посттрансляционной модификации. Известно, что обработка корешков *Arabidopsis*  $H_2O_2$  становится причиной значительного изменения подвижности GSL в нативном полиакриламидном геле (Hickset et al, 2007). Протеомный анализ хлоропластов с использованием масс спектрометрии

24

показал, что для GCL растений предпочтительной является димерная форма (Peltieret al, 2006).

В эукариотических клетках активность GCL контролируется на уровне регуляции активности фермента, и с помощью регуляции транскрипции генов, кодирующих этот фермент. В свою очередь, транскрипция находится под контролем нескольких регуляторных систем. Например, транскрипция GSH1, кодирующего белок GCL в S. cerevisiae, находится под контролем Met4, транскрипционного фактора также регулирующего синтез серосодержащих аминокислот. В зависимости от доступности GSH этот фактор является или активатором, или ингибитором транскрипции GSH1 (Wheeler et al, 2002). Кроме того, экспрессия GSH1 индуцируется оксидантами, например, перекисью водорода, а также тепловым шоком. В обоих случаях в регуляцию GSH1 вовлечен транскрипционный фактор Yap1, необходимый для ответа дрожжевой клетки на окислительный стресс (Stephen and Jamieson, 1997, Sugiyama et al, 2000). Более того, промотор GSH1 имеет два элемента, участвующих в ответе на присутствие перекиси водорода, отличных от сайта связывания для Yap1, что указывает на наличие дополнительных факторов регуляции экспрессии гена (Wu and Moye-Rowly, 1994). каталитической субъединицы В промоторе GCLC человека идентифицировано много элементов, которые отвечают на воздействие антиоксидантов (ARE), электрофилов (EpRE), металлов (MRE). Многие ближайший исследования подтвердили, ЧТО OT начала инициации транскрипции элемент АР-1 (от -263 до -269) влияет на усиление экспрессии GCLC в ответ на оксидативный стресс (Lu, 2009).

Важную роль в регуляции активности белка GCL играет ретроингибирование GSH. Сайты связывания GSH и глутамата совпадают, и это приводит к конкурентному ингибированию (Richman and Meister, 1975). Исследования с использованием таких аналогов GSH как офтальмовая кислота, S-метил-глутатион и окисленный GSH GSSG показали, что для

максимального ингибирования GCL необходима восстановленнная форма GSH (Richman and Meister, 1975, Griffith and Mulcahy, 1999).

Биоинформационный анализ, проведенный Veeravalli с группой, видов прокариот, показал. что y некоторых которые содержат глутатионзависимые белки, отсутствуют гены синтеза GSH. Авторы изолировали штамм E. coli, несущий делецию гена GCL, с физиологической концентрацией GSH. Данный штамм содержал мутации в первых двух генах ProB и ProA, которые супрессировали синтез биосинтеза пролина  $\gamma$ -глутамилцистеина (Veeravalli et al, 2011).

#### 2.4.2. Глутатион синтетаза

Фермент GS катализирует вторую АТФ-зависимую реакцию синтеза GSH, в результате которой происходит образование интермедиата γ-глутамилцистеил фосфата и последующая его конденсация с глицином.

Фермент GS входит в суперсемейство АТФ-связывающих белков, к которому также относятся D-аланин:D-аланин лигаза, рибосомальный белок S6:глутамат лигаза, α-L-глутамат лигаза, вовлеченная в синтез коэнзима тетрагидросарциноптерина и другие (Li et al, 2003, Dinescu et al, 2004). Данное семейство насчитывает в своем составе 21 белок, каждый из которых содержит АТФ-связывающий сайт с уникальной для этого семейства укладкой (Fawaz et al, 2011).

белков, относящихся Рассмотрим структуру суперсемейству К АТФ-связывающих, на примере структуры GS дрожжей. Данный фермент состоит из двух доменов, большого и малого. В свою очередь большой домен имеет характерную α/β укладку и состоит из топологических субдоменов, из образован которых один спиралями, упакованными напротив антипараллельного β-листа, а другой – спиралями, упакованными напротив параллельного В-листа. После сборки субдоменов образуется основной глобулярный домен. Малый домен («крышка») состоит из антипараллельного β-листа и спиралей, упакованных на одной стороне, в результе чего

образуется выступ, который топологически соединяет два субдомена основного домена. Активный сайт, который четко разграничен связанными субстратами –  $AT\Phi$ ,  $Mg^{2+}$  и  $\gamma$ -глутамил-цистеином – формируется благодаря сопряжению аминокислотных остатков двух субдоменов и малого домена. В отсутствие субстратов «крышка» может вращаться под углом 68 градусов по отношению к большому домену, оставляя активный сайт полностью открытым. Петля малого домена, богатая глицином и формирующая часть сайта связывания ATФ/Mg<sup>2+</sup>, в апоферменте имеет неупорядоченную структуру. После присоединения субстратов, структура активного сайта стабилизируется, гибкая «крышка» приобретает упорядоченную И конфигурацию (Gogos and Shapiro, 2002).

На основании сравнения нуклеотидных последовательностей GS *E.coli* и *S. cerevisiae* с помощью BLAST, ферменты разделили на две группы – бактериальные и эукариотические, т.к. согласно сравнению нуклеотидных последовательностей обеих групп, гомология между ними фактически отсутствует (Copley and Dhillon, 2002). Несмотря на общее структурное сходство GS между группами, из 11 аминокислотных остатков фермента, вовлеченных в связывание GSH, только 2 остатка являются консервативными (Polekhina et al, 1999).

Самый активный среди выделенных ферментов млекопитающих препарат GS был получен из ткани почек крысы. Этот белок имеет молекулярную массу приблизительно  $118 \pm 4$  кДа и состоит из двух почти идентичных субъединиц. Гомогенные препараты GS, полученные из дрожжей, эритроцитов человека и почки крысы, близки по молекулярным массам, 123 кДа, 150 кДа, 118 кДа, соответственно (Oppenheimer et al, 1979). GS *E. coli* состоит из четырех гомологичных субъединиц с молекулярной массой примерно 38 кДа каждая (Gushima et al, 1984).

## 2.4.3. ү-Глутамилцистеин-глутатион синтетаза

Большинство организмов содержат ферменты GCL и GS, кодируемые отдельными генами, которые могут располагаться довольно далеко друг от друга. Однако, во многих видах грамположительных, нескольких видах грамотрицательных бактерий и протеобактериях эти ферменты кодируются одной открытой рамкой считывания. К примеру, в *Streptococcus agalactiae* аннотировали нуклеотидную последовательность, с которой считывается один белок, выполняющий роль GSL и GS. Выделенный белок был первым идентифицированным ферментом биосинтеза GSH в грамположительных бактериях и первой известной бифункциональной  $\gamma$ -глутамилцистеинглутатионсинтетазой ( $\gamma$ -GCS–GS). N-концевая последовательность  $\gamma$ -GCS–GS длиной 518 ак. о. показала гомологию 32% с GSL *E.coli*. С-концевая последовательность из 360-375 ак. о. имела слабую гомологию с D-аланин: d-аланин лигазой; а известно, что этот белок также как и GS относятся к суперсемейству АТФ-связывающих белков (Janowiak and Griffith, 2005, Fan et al, 1995).

бифункциональной γ-GCS–GS Одновременно с открытием y Streptococcus agalactiae, было показано наличие подобного гибридного фермента в Listeria monocytogenes and Pasteurella multocida (Gopal et al, 2005, al. 2006). BLAST Vergauwen et анализ показал, что 13 вилов грамположительных бактерий, относящихся к отделу Firmicutes, 4 вида грамотрицательных бактерий, а также несколько видов протеобактерий имеют высокогомологичные с белком у-GCS-GS последовательности, что говорит о довольно широком распространении такого химерного фермента среди прокариот (Janowiak and Griffith, 2005).

#### 2.5. Деградация GSH. Ферменты деградации GSH

Деградация и синтез GSH в клетках происходит постоянно и гораздо быстрее, чем считалось ранее. В работе Jaspers с соавторами, в которой был использован меченый L-[U-<sup>14</sup>C-глутамил]-GSH, показано, что время

полужизни GSH в культуре *S. cerevisiae*, выращенной на разных источниках азота, колеблется от 220 до 990 минут (Jaspers et al, 1985). В более поздних работах по исследованию метаболизма серы в клетках *S. cerevisiae* было продемонстрировано, что при стандартных условиях (рост на минимальной среде с добавлением 0,1 мМ ионов сульфата и 30 мМ ионов аммония) время полужизни GSH составляет 90 минут. Данная работа проводилась посредством экспозиции клеток *S. cerevisiae* меченой серой ( $^{35}$ S) с последующей обработкой результатов с помощью математического анализа (Baudouin-Cornu et al, 2012).

Деградация GSH в клетках *S. cerevisiae* зависит от условий роста. Так, голодание по сере и рост на среде с GSH в качестве единственного источника серы, приводит к увеличению деградации GSH в клетках, а экспозиция кадмием ( $Cd^{2+}$ ) наоборот, к замедлению (Baudouin-Cornu et al, 2012).

В течение длительного времени считалось, что разложение GSH происходит вне цитоплазмы клетки. Такое мнение существовало потому, что был известен только один фермент деградации GSH – у-глутамилтрансфераза (GGT). Белок GGT локализован цитоплазматической мембране В млекопитающих и бактерий, а в дрожжах и растениях – в вакуолярной мембране, соответственно фермент может использовать в качестве субстрата внеклеточный и вакуолярный пулы GSH. И только в последние годы открытие новых ферментов деградации GSH, расположенных в цитоплазме клеток, пролило свет на многообразие путей его метаболизма (Bachhawat and Kaur, 2017).

При наличии одних тех же ферментов, пути деградации GSH отличаются в растениях и млекопитающих (Ohkama-Ohtsu et al, 2008). Показано, что у млекопитающих GGT и дипептидаза находятся в наружной мембране, за счет чего, первые этапы деградации GSH совершаются вне клетки (Meister and Anderson, 1983, Wang and Ballatori, 1998).

У растений деградация GSH происходит внутриклеточно в основном за счет деятельности γ-глутамилциклотрансферазы, а белок GGT играет незначительную роль в общем катаболизме GSH (Ohkama-Ohtsu et al, 2008).

У низших эукариот, таких как дрожжи, идентифицировали три фермента деградативной части ү-глутамильного цикла – ү-глутамилтрансферазу, цистеинилглицин-дипептидазу и ү-глутамилциклотрансферазу. Белок GGT локализован в вакуолях, цистеинилглицин дипептидаза и ү-глутамилциклотрансфераза – в цитоплазме. Причем, ү-глутамилциклотрансфераза имеет субстратную специфичность только к восстановленному GSH (Jaspers et al, 1985, Ganguli et al, 2007, Kumar et al, 2012).

Несколько десятилетий считалось, что GGT является единственным ферментом, участвующим в деградации GSH, и соответственно ключевым звеном γ-глутамильного цикла. Однако исследования последних лет, помимо понимания значения ферментов γ-глутамильного цикла, показали, что деградация GSH может осуществляться несколькими путями (Bachhawat and Kaur, 2017). Ниже будут рассмотрены разные пути деградации GSH, а также ферменты, которые участвуют в этом процессе.

## 2.5.1. ү-Глутамилтрансфераза

γ-Глутамилтрансфераза (GGT) представляет собой эволюционно консервативный мембраносвязанный фермент, гликопротеин, который специфично катализирует перенос γ-глутамильного остатка с GSH на акцептор, в качестве которого могут выступать вода, аминокислоты, пептиды или сам GSH. Три основных типа реакций, осуществляемых GGT, показаны на примере реакций 1-3 (Tate and Meister, 1981):

1. Транспептидирование:

GSH + L-аминокислота ↔ L-γ-глутамил-L-аминокислота + L-цистеинилглицин;

2. Автотранспептидирование:

2 GSH  $\leftrightarrow$  L- $\gamma$ -глутамил-GSH + L-цистеинилглицин;

3. Гидролиз:

GSH + H<sub>2</sub>O → L-глутамат + L-цистеинилглицин.

Белок GGT суперсемейству относится N-терминальных К нуклеофильных гидролаз, для которых характерно наличие активной аββа структуры и пострансляционного процессинга неактивного предшественника. После автокаталитического расщепления пропептида образуется зрелый белок, который в новой N-концевой области может содержать треониновый, сериновый цистеиновый остатки. Эти или аминокислотные остатки становятся каталитическими нуклеофилами фермента (Inoue et al, 2000, Suzuki and Kumagai, 2002, Kinlough et al, 2005, Okada et al, 2006).

С момента своего открытия в почках овцы в 1950 году (Hanes and Hird, 1950), GGT была выделена из различных источников, от бактерий до млекопитающих. Секвенирование нуклеотидных последовательностей GGT из разных групп организмов обнаружило между ними гомологию больше 25%. Все описанные в литературе GGT состоят из двух субъединиц – малой и большой. (Castellano Merlino, 2012) and Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что обе субъединицы кодируются одной открытой рамкой считывания (Coloma and Pitot, 1986, Goodspeed et al, 1989, Papandrikopoulou et al, 1989, Laperche et al, 1989, Ogawa et al, 1997). Активный сайт связывания γ-глутамильного остатка находится в N-концевой субъединицы, области малой которая ассоциирована большой с субъединицей посредством нековалентных взаимодействий (Tate and Meister, 1976, 1981).

Молекулярная масса двух цепей GGT колеблется от 38 до 72 кДа для большой субъединицы и 20-66 кДа для малой (Chevalier et al, 1999, Nakayama et al, 1984, Suzuki et al, 1986, Ogawa et al, 1997). Такая вариабельность молекулярных масс объясняется высокой степенью гликозилирования GGT в тканях растений и животных (Martin and Slovin, 2000, Lancaster and Shaw, 1994). Белок GGT *E.coli* K12 показывает высокое сходство структуры в консервативных участках с GGT млекопитающих. Не имеют гомологии только первые 50 нуклеотидов N-концевой области белка. Это связано с тем, что GGT млекопитающих относится ко второму типу трансмембранных белков. N-концевой сигнальный пептид большой субъединицы таких белков не отщепляется, а остается в качестве трансмембранного домена, локализованного на наружной стороне плазматической мембраны (Tate and Meister, 1981, Kinlough et al, 2005). N-концевой сигнальный пептид GGT *E.coli* отрезается, в результате чего, зрелая GGT становится растворимым белком периплазматического пространства (Suzuki et al, 1989).

Фермент GGT *E.coli* является негликозилированным белком, тогда как GGT всех высших эукариот относят к гликопротеинам, причем сахаридная часть GGT показывает высокую гетерогенность и органоспецифичность (Yamashita et al, 1983).

В Arabidopsis найдено 3 типа  $\gamma$ -глутамилтрансфераз GGT1, GGT2, GGT4. Белки GGT1 и GGT2 локализованы в плазматической мембране каталитическими центрами в сторону апопластов. Фермент GGT1 участвует в деградации окисленного GSH, GGT2 вовлечен в транспорт GSH в стручках *Arabidopsis*, а GGT4 локализуется в вакуолях, где принимает участие в деградации конъюгатов GSH (Grzam et al, 2007, Ohkama-Ohtsu et al, 2007a, 2007b, 2008).

Секвенирование GGT человека показало, что этот фермент относится к мультигенному семейству, в состав которого входит 13 гомологов и только два из них, гены – GGT1 и GGT5 – кодируют белки с ферментативной активностью. Несмотря на то что аминокислотная последовательность выявила высокую идентичность (40%) между белками GGT1 и GGT5 (Heisterkamp et al, 2008), GGT5 показала активность менее 4% по сравнению с GGT1 при гидролизе GSH, GSSG и лейкотриена C4 (Wickham and et al, 2011). Белки GGT1 и GGT5 локализованы в цитоплазматической мембране каталитическим центром во внеклеточную среду (Bachhwat and Kaur, 2017). Клетки *S. cerevisiae* содержат одну GGT, кодируемую геном *ECM38*. Белок GGT локализован в вакуолярной мембране и своим активным центром обращен в полость вакуоли (Jaspers and Penninckx, 1984).

Функциональная активность GGT в клетках эукариот регулируется на уровне транскрипции м-РНК и на уровне изменения активности белка различными оксидантами, а также соединениями, генерирующими радикалы кислорода (Markey et al, 1998, Liu et al, 1998, Whitfield, 2001). Такие вещества как алкоголь, лекарства, канцерогены способны увеличивать экспрессию GGT в несколько раз в различных клетках и тканях (Brown et al, 1998, Griffiths et al, 1995).

В *S. cerevisiae* экспрессия *ECM38* зависит от природы источника азота. Репрессия *ECM38* происходит при росте на богатых источниках азота, таких как глутаминовая кислота или ионы аммония, а рост на бедных источниках азота, таких как пролин и мочевина, приводит к дерепрессии гена. Анализ промоторной области *ECM38 S. cerevisiae* показал наличие восьми GAT(T/A)A нуклеотидных повторов, которые являются регуляторными элементами для взаимодействия с транскрипционными факторами, которые относятся к семейству GATA белков и содержат домены типа «цинковые пальцы». Участники данного семейства Nill/Gat1 и Gln3 позитивно регулируют транскрипцию *ECM38* (Stanbrough et al, 1995, Goffman et al, 1996), а Gzf3 (то же семейство) действует как негативный регулятор при росте на различных источниках азота (Springael and Penninckx, 2003).

Основной биологической ролью GGT в эукариотических организмах является поддержание гомеостаза GSH и цистеина в клетках (Hanigan and Ricketts, 1993), а также участие в работе эндогенной антиоксидантной системы в клетках (Forman and Skelton, 1990). Белок GGT играет важную роль в метаболизме естественных биомолекул, таких как лейкотриен E4, простагландины, эстрогены, а также ксенобиотиков, после их конъюгации с GSH. Удаление γ-глутамильного остатка с глутатионовых конъюгатов инициирует конверсию таких компонентов в меркаптуровые кислоты в

реакциях детоксификации (Zhang et al, 2005). Недостаточность γ-глутамилтрансферазной активности у мышей приводит к глутатионурии, глутатионемии, замедленному росту, катаракте, летаргии, укороченному времени жизни и отсутствию фертильности (Ristoff and Larsson, 2007).

Многими авторами показано изменение активности GGT при заболеваниях печени, сердечно-сосудистой системы, диабете и раке (Vanderlaan and Phares, 1981, Wannamethee et al, 1995, Hanigan, 1998, Whitfield, 2001, Arkkila et al, 2001). Хотя биологический смысл вовлечения GGT в патологические процессы еще не изучен, изменение активности GGT уже долгие годы используется в медицине в качестве клинического маркера многих заболеваний. Например, GGT является высокоспецифичным и информативным маркером заболеваний гепато-билиарной системы потому, что повышение активности GGT появляется на ранних сроках повреждения гепатоцитов и удерживается на высоком уровне довольно длительное время (Lum and Gambino, 1972, Rosalki, 1975). Определение активности GGT широко используется в качестве маркера алкогольного повреждения печени, а также для контроля лечения алкоголизма (Rosalki and Rau, 1972).

#### 2.5.2. Суперсемейство ү-глутамилциклотрансфераз

Суперсемейство  $\gamma$ -глутамилциклотрансфераз включает белки, для которых характерна определенная структура, представляющая собой  $\beta$ -складку, окруженную  $\alpha$ -спиралью. Такую структуру впервые описали в бактериальном (*Bacillus circulans*) белке BtrG и белке млекопитающих  $\gamma$ -GCT ( $\gamma$ -глутамилциклотрансфераза) и назвали ее соответственно BtrG/ $\gamma$ -GCT укладка (Pucyhok 5 из Oakley et al, 2008).



A. thaliana

Рисунок 5 – Схематическая диаграмма ү-GCT человека и ее ортологов из E. coli, Pirococcus horikoshii, Mus musculus 🛚 A. thaliana

Субстратами суперсемейста являются различные белков ЭТОГО у-глутамильные соединения, которые после ферментативной реакции дают лишенный соответствующий компонент, глутамильной группы, И 5-оксопролин. К этому семейству относятся у-GCT, которая катализирует превращение различных у-глутамил-аминокислот В 5-оксопролин И свободные аминокислоты (Oakley et al, 2008); ү-глутамиламинциклотрансфераза ИЗ клеток млекопитающих, которая катализирует образование 5-оксопролина и амина (Oakley et al, 2008); бактериальный белок BtrG, который катализирует образование бутирозина и 5-оксопролина (Llewellyn et al, 2007); белки семейства ChaC (Kumar et al, 2012).

#### 2.5.2.1. ү-Глутамилциклотрансфераза

Несмотря на то что существование γ-глутамилциклотрансферазной активности было продемонстрировано несколько десятилетий назад (Orlowski et al, 1973) и фермент, осуществляющий эту реакцию, был выделен из эритроцитов человека (Board et al, 1978), ген γ-GCT (C7orf24) удалось клонировать только в 2008 году (Oakley et al, 2008).

Изучение кристаллической структуры γ-GCT обнаружило, что отрицательный заряд остатка глутамата в 98 положении необходим для взаимодействия с положительно заряженной аминогруппой субстрата. Замена Glu98 на глутамин приводит к полной потере каталитической активности белка без изменения его структуры (Oakley et al, 2008).

Фермент γ-GCT катализирует расщепление γ-глутамильных дипептидов с образованием 5-оксопролина и соответствующих аминокислот. Субстратная специфичность γ-GCT была определена по отношению к ү-глутамильным производным с метионином, аланином и глутамином. Интересно, что не было обнаружено активности γ-GCT по отношению к ү-глутамильным дипептидам с лейцином и валином, что говорит об ее избирательной субстратной специфичности (Orlowski and Meister, 1973).
Надо заметить, что фермент γ-GCT с широкой субстратной специфичностью был найден только у млекопитающих (Oakley et al, 2008). Гомологи γ-GCT, найденные у растений и дрожжей не обнаружили активность по отношению к γ-глутамильным аминокислотам (Bachhawat and Kaur, 2017).

### 2.5.2.2. Семейство ChaC белков: Cha1и Cha2. Их физиологическая роль

Белки ChaC деградируют GSH с образованием 5-оксопролина и Cys-Gly. Обозначение ChaC произошло от первого описанного представителя семейства ChaC белков, который входит в состав оперона CHA (Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> транспортер) *E.coli* (Ivey et al, 1993).

Участники ChaC семейства найдены во многих организмах – бактериях, дрожжах и высших эукариотах. Высшие многоклеточные организмы содержат два паралога ChaC семейства: ChaC1 и ChaC2. В *E.coli* и дрожжах аннотировано по одному гомологу, ChaC и GCG1, соответственно (Kumar et al, 2016). У млекопитающих ChaC1 был впервые идентифицирован как проапоптический фактор, который индуцируется во время стресса эндоплазматического ретикулума (Mungtue et al, 2009).

Несмотря на то, что ChaC1 показал гомологию 88%, а ChaC2 – 94% при сравнении аминокислотных последовательностей белков мыши и человека, гомология между ChaC1 и ChaC2 составляет только 50%. Построение филогенетического дерева членов ChaC семейства из разных организмов показало, что ферменты ChaC1 и ChaC2 являются представителями двух различных филогенетических ветвей (Kaur et al, 2016).

Детальное исследование ChaC1 показало, что, несмотря на то что белок относится к семейству γ-глутамилциклотрансфераз, содержащих структуру BtrG/GGCT, он специфически взаимодействует только с GSH и не проявляет никакой активности по отношению к γ-глутамильным пептидам. Более того, ChaC1 активен только по отношению к востановленному GSH (Kumar et al,

2012, Crawford et all, 2014).  $K_{M}$  ChaC1 для GSH находится в районе 2-3 мМ (Kumar et al, 2012).

Одной из физиологических функций ChaC1 считают обеспечение клеток необходимыми аминокислотами в условиях стресса. При активации ChaC1 усиливается деградация GSH, в результате чего клетка обеспечивается важными аминокислотами: L-глутаматом, L-цистеином и глицином (Bachhawat and Kaur, 2017).

Другая функция ChaC1, возможно, связана с регулированием окислительного-восстановительного потенциала в клетке. Известно, что соотношение GSH:GSSG различается в цитоплазме и эндоплазматическом ретикулуме (ЭР): от 30:1 до 100:1 в цитоплазме и от 1:1 до 1:3 в ЭР (Hwang et al, 1992). Поддержание окисленного GSH в ЭР на высоком уровне необходимо для образования дисульфидных связей И правильного сворачивания большого числа образующихся в нем белков. Дисульфид изомераза и другие оксиредуктазы используют GSSG в качестве акцептора протонов водорода в реакциях тиол-дисульфидного обмена (Noiva and Lennarz, 1992). Низкое соотношение GSH:GSSG в ЭР поддерживается импортом GSSG из цитозоля и, возможно, экспортом GSH из ЭР в цитоплазму (Hwang et al, 1992).

Учитывая тот факт, что белок ChaC1 специфично взаимодействует только с восстановленным GSH, внезапная индукция его синтеза может приводить к резкому изменению соотношения GSH:GSSG, результатом которого становится окислительный сдвиг клеточного редокс-статуса, что, в свою очередь, может инициировать каскады путей чувствительных к изменению окислительно-восстановительного потенциала клетки (Bachhawat and Kaur, 2017). Например, как было обнаружено в *S. cerevisiae*, экспрессия гена ChaC1 млекопитающих в клетках дрожжей влияла на уровень восстановленного GSH, что приводило к изменению редокс-сигналов внутриклеточной среды, в результате которого происходила активация кальциевых транспортеров (Chandel et al, 2016). Экспрессия гена ChaC1 находится под строгой регуляцией при различных условиях, к которым относятся стресс в эндоплазматическом ретикулуме (Mungtue et al, 2009), голодание по аминокислотам (Tattoli et al, 2012), рак (Goebel et al, 2012, Joo et al, 2012, Selvik et al, 2013), диабет и вирусные инфекции (Tang et al, 2013, Zhang et al, 2008), атеросклероз (Romanoski et al, 2011).

В отличие от ChaC1, гомологи белка ChaC2 найдены во всех типах организмов, включая одноклеточных и высших многоклеточных. Исследования белка ChaC2 человека, мышей и дрожжей, показали, что эти ферменты находятся в цитозоле, их субстратом является восстановленный GSH, а продуктами деградации 5-оксопролин и CG (Kaur et al, 2016).

Несмотря на то, что белки семейства ChaC имеют структуру BtrG/GGCT и используют один и тот же субстрат, каталитическая эффективность ChaC1 и ChaC2 сильно отличается. При сравнимой  $K_{M}$  у ChaC1 и ChaC2 для GSH, 2,2 мМ и 3,7 мМ, соответственно,  $K_{kar}$  ChaC1 и ChaC2 по отношению к GSH отличается в 14 раз и составляет 15,9 и 225 мин.<sup>-1</sup>, соответственно. Из этого следует, что белок ChaC2 может взаимодействовать с GSH с эффективностью в 10-20 раз меньше, чем белок ChaC1 (Kaur et al, 2016).

Филогенетический анализ показал, что ортологи ChaC1 присутствуют только в высших эукариотах, в то время как ChaC2 – более древняя ветвь белков, которые были найдены во всех группах организмов. И хотя филогенетическое разделение в некоторых случаях не так отчетливо, изучение ChaC из *E. coli* и GCG1 из *S. cerevisiae* показало, что ферменты этих организмов имеют кинетические характеристики более близкие к ChaC2, чем к ChaC1 (Kaur et al, 2016).

Интересно, что в *A. thaliana* нашли три гомолога ChaC2 белков: GGCT2;1, GGCT2;2, GGCT2;3 и ни одного гомолога ChaC1. Активность белка GGCT2;1 регулируется голоданием по сере и функционально он ближе к ChaC1 (Kumar et al, 2015); GGCT2;2, GGCT2;3 функционально похожи на других членов ChaC2 группы. Все GGCT2 гомологи *A. thaliana* находятся в цитоплазме и обладают низкой каталитической активностью (Kumar et al, 2015, Paulose et al, 2013).

В отличие от ChaC1 белков, фермент ChaC2 млекопитающих не любых известных условиях. Базальный индуцируется при уровень экспрессии гена ChaC2 выше, чем ChaC1, и не изменяется в норме и при стрессе, в отличие от гена ChaC1, транскрипция которого строго зависит от наличия аминокислотного голодания и стресса эндоплазматического ретикулума. Это подтверждает гипотезу, что ChaC2 является конститутивно экспрессируемым белком, предназначенным для постоянного медленного катаболизма GSH, а ChaC1 активируется BO время стресса ДЛЯ неопределенных окончательно целей (Kaur et al, 2016).

Инактивация GCG1, гомолога ChaC2 дрожжей, не выявила видимого фенотипа, а делеция ChaC *E. coli* показала незначительное изменение в подвижности клеток (Kumar et al, 2016).

Таким образом, можно что ChaC2 является сделать вывод, ферментом с низкой каталитической активностью «примитивным» И функционирует в первую очередь в качестве белка «домашнего хозяйства». В то же время ChaC1 эволюционно «молодой» фермент, появившийся значительно позже только у высших организмов и, похоже, взявший на себя функции защитного белка, участвующего в ответных реакциях клеток на стресс и/или влияющего на сигнальные пути.

#### 2.5.3. Оксопролиназы

5-Оксопролиназы катализируют АТФ-зависимую реакцию гидролиза 5-оксопролина с образованием глутамата. 5-Оксопролин – это циклическое производное глутамата (так же называемая пироглутаматом), которая образуется в результате ряда ферментативных реакций, катализируемых белками суперсемейства γ-глутамилциклотрансфераз (Kumar and Bachhawat, 2012). 5-Оксопролиназы играют важную роль в регенерации глутамата.

40

Накопление 5-оксопролина в таких биологических жидкостях как моча, кровь и спинномозговая жидкость приводит к серьезному метаболическому ацидозу, гемолитической анемии и дисфункции центральной нервной системы у человека (Dahl et al, 1997). Таким образом, своевременное удаление 5-оксопролина из биологических жидкостей является физиологически важным процессом, а 5-оксопролиназа это единственный известный в настоящее время фермент, который утилизирует 5-оксопролин в клетках эукариот (Kumar and Bachhawat, 2017).

Высокоочищенная 5-оксопролиназа была получена из ткани почек крысы и бактерий *Pseudomonas putida*. 5-Оксопролиназа крысы состоит из двух почти идентичных, субъединиц, которые удерживаются вместе посредством сильных взаимодействий, тогда как 5-оксопролиназа P. putida состоит из двух функционально различных, легко диссоциирующих белковых компонентов А и В. Компонент А участвует в АТФ-зависимом фосфорилировании, присоединенного ферментом 5-оксопролина, а компонент В участвует в совместном с компонентом А гидролизе субстрата. Изучение механизма действия 5-оксопролиназ показало неожиданное сходство с гидантоиназами, которые также способны гидролизовать имидную связь пятичленного кольца, но при этом 5-оксопролиназы не всегда нуждаются в наличии AT $\Phi$  (Guo-jie et al, 1996).

Белок Oxp1 *S. cerevisiae* был описан в 2010 году как ATФ-зависимая 5-оксопролиназа, состоящая из 1286 аминокислот. Исследование характеристик очищенной рекомбинантной 5-оксопролиназы дрожжей показало, что белок является димером с  $K_{M}$  для 5-оксопролина 159 мкМ. Белок Oxp1, как и 5-оксопролиназа *P. putida*, состоит из двух легко диссоциирующих компонентов, которые, похоже, тоже выполняют разные функции (Kumar and Bachhawat, 2010).

Новый тип АТФ-независимой 5-оксопролиназы была обнаружен в бактериях *Alcaligenes faecalis* N-38A. Анализ очищенного белка показал, что он являетстя мономером с молекулярной массой 47 кДа. Фермент

41

специфически катализировал дециклизацию L-пироглутамата без гидролиза АТФ (Nishimura et al, 1998).

Несмотря на то, что 5-оксопролиназы есть во многих организмах, даже неспособных к образованию GSH (что указывает на множественные пути образования 5-оксопролина), почти ничего неизвестно о регуляции синтеза этой группы ферментов (Kumar and Bachhawat, 2017).

### 2.5.4. Cys-Gly пептидазы

Независимо от присутствия ферментов, которые инициируют деградацию GSH, дипептид Cys-Gly является неизменным продуктом любой реакции катаболизма GSH. Последующая пептидазная реакция разложения Cys-Gly очень важна для клетки для восстановления пулов цистеина и глицина, кроме того, накопление Cys-Gly оказывает токсическое действие на клетку (Kaur et al, 2009).

По причине того, что катаболизм GSH происходит и в цитоплазме, и вне ее, пептидазы, деградирующие Cys-Gly, найдены как в цитозоле, так и во внеклеточном пространстве. Известные дипептидазы относятся к семействам М17, М19, М1 и М20 металлопептидаз (Kumar and Bachhawat, 2017).

### 2.5.4.1. Цитозольные Cys-Gly пептидазы. Металлопептидазы семейства M17 и M20A

В состав семейства M20A металлопептидаз входят дипептидаза дрожжей Dug1 и пептидаза млекопитающих CNDP1. Изначально белок Dug1 был идентифицирован в дрожжах в качестве компонента альтернативного пути деградации GSH, который обладает пептидазной активность по отношению к Cys-Gly. Было показано, что ген *DUG1* кодирует главную Cys-Gly дипептидазу *S. cerevisiae*, так как штамм с делецией этого гена не может использовать GSH и Cys-Gly в качестстве единственного источника серы. Также в результате инактивации *DUG1* увеличивалась внутриклеточная концентрация дипептида. Исследование характеристик

Dug1 *in vitro* показало, что белок является гомодимером и функционирует как цинк- или марганец- зависимая пептидаза. Белок Dug1 имеет высокую субстратную специфичность к дипептиду Cys-Gly, в то время как три- и тетрапептиды не являются его субстратами (Kaur et al, 2009).

Активность белка CdpA, который охарактеризован как гомолог Dug1 в *Aspergillus oryzae*, была проверена на нескольких субстратах. Белок CdpA показал высокую субстратную специфичность (за 100% была взята активность по отношению к Cys-Gly) по отношению к Ala-Cys, Leu-Cys, Cys-Ala (161%, 132%, 95%, соответственно) и так же, как и Dug1, не катализировал деградацию трипептидов (Hattori et al, 2011).

Два гомолога Dug1 было найдено у человека – CNDP1 и CNDP2. Белок CNDP1 – это карнозиназа, субстратом которой является  $\beta$ -Ala-His, или карнозин; в то время как белок CNDP2 описан как карнозин-подобная дипептидаза. При этом только CNDP2 активен по отношению к Cys-Gly ( $K_{M}$  0,6 мМ) и комплементирует инактивацию Dug1 в дрожжах при росте на Cys-Gly в качестве единственного источника серы. Белок CNDP2, как и Dug1, не проявляет никакой активности по отношению к три- и тетрапептидам (Kaur et al, 2009).

Интересно отметить, что несмотря на наличие Cys-Gly дипептидаз, относящихся к семейству M20 металлопиптедаз, в дрожжах и у человека, гомологи этого семейства отстствуют в бактериях и растениях (Kumar and Bachhawat, 2017).

Металлопептидазы семейства М17 были описаны как дипептидазы II, аминолейцил-пептидазы, лейцил-пептидазы, лейцил-аминопептидазы (LAP), цитозольные пептидазы или просто пептидазы. Представители семейства M17 металлопептидаз найдены в растениях, животных, некоторых дрожжах (хотя в *S. cerevisiae* отсутствуют).

Белок LAP, выделенный из хрусталика глаза быка является гексамером, который предпочитает в качестве субстрата дипептиды, содержащие в N-концевой области алифатические аминокислоты с объемным радикалом. Каждая субъединица белка содержит по два сайта для присоеденения ионов цинка, которые необходимы для каталитической активности. Ионы цинка могут заменяться другими двухвалентными катионами с определенной избирательностью: так в одном из сайтов  $Zn^{2+}$  легко может заменяться  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  или  $Co^{2+}$ , второй сайт селективно взаимодействует с  $Zn^{2+}$  или  $Co^{2+}$ . Вариабельность ионов в первом сайте отражается на субстратной специфичности фермента (Cappiello et al, 2006).

Недавно LAP была охарактеризована в качестве основного фермента, гидролизующего Cys-Gly в печени крысы и хрусталике глаза быка (Josch et al, 2003, Cappiello et al, 2004). Максимальная эффективность гидролиза с  $K_{M}$  0,57 мM для Cys-Gly по сравнению с другими дипептидами была продемонстрирована при введении в первый сайт белка LAP Mn<sup>2+</sup> (Cappiello et al, 2004).

Пептидаза LAP1 из *A. thaliana* была давно охарактеризована как цитозольная пептидаза, но ее способность гидролизовать Cys-Gly никогда не тестировалась. Белок LAP-A из томатов был единственным известным ферментом растений с низкой пептидазной активностью по отношению к Cys-Gly. Фермент LAP-A показал самое высокое сродство к Arg-Leu и Leu-Leu среди проверенных ди- и трипептидов.  $K_{\rm M}$  белка LAP-A, показанная для Arg-Leu (1,4 мM), была близка к  $K_{\rm M}$  очищенного белка LAP1 из *A. thaliana*, измеренной для Cys-Gly (1,3 мM) (Kumar et al, 2015).

## 2.5.4.2. Мембраносвязанные Cys-Gly металлопептидазы. Аминопептидаза N и мембранная дипептидаза

Аминопептидаза N является членом семейства металлопептидаз M1. Ферменты данного семейства широко представлены в различных тканях млекопитающих, в почках, печени, мозге, кишечнике, плаценте. Белки M1 семейства металлопептидаз действуют на N-концевые аминокислоты коротких и длинных олигопептидов. На культуре нейронов крысы было показано, что аминопептидаза N, ассоциированная с плазматической мембраной нейронов, участвует в деградации Cys-Gly, который образуется в результате действия мембранной GGT астроцитов на внеклеточный пул GSH. Таким образом, аминопептидаза N является важным ферментом для метаболической кооперации между астроцитами и нейронами при метаболизме GSH в мозге (Dringen et al, 2001).

Аминопептидаза N, выделенная из ткани почек крыс, имеет  $K_{M}$  1,2 мM по отношению к Cys-Gly. Считается, что на этот фермент приходится 50% пептидазной активности, связанной с утилизацией Cys-Gly в почках крысы (McIntyre and Curthoys, 1982).

Мембранная дипептидаза (MDP) была найдена во многих тканях разных видов животных и человека.  $Zn^{2+}$ -зависимая металлопротеаза MDP расположена на клеточной поверхности за счет гликозил-фосфатидил-инозитольного (GPI) якоря и способна гидролизовать различные дипептиды (Nitanai et al, 2002), причем этот фермент активен только по отношению к дипептидам (Campbell et al, 1966).

Белок MDP показал принципиальную активность по отношению S-N-этилмалеимид-L-цистеинил-глицину, S-производным L-цистеинилглицина, L-цистеинил-бис-глицину, что говорит о важной его роли в метаболизме GSH и его конъюгатов (Nitanai et al, 2002). У мышей с инактивированной MDP повышается уровень L-цистеинил-бис-глицина, который является продуктом активности GGT (Kosak and Tate, 1981, Nitanai et al, 2002).

# 2.5.5. Альтернативный путь деградации GSH в *S. cerevisiae* комплексом (Dug2p-Dug3p)<sub>2</sub>

Специфичный путь деградации GSH был найден в грибах. Китаг и соавторы в своей работе показали возможность использования GSH в качестве единственного источника серы в штамме *S. cerevisiae*, несущем делеции гена *MET15*, кодирующего О-ацетил-гомосерин О-ацетил серин сульфогидролазу, необходимую для биосинтеза метионина и цистеина, и гена

*ECM38*, кодирующего  $\gamma$ -глутамилтрансферазу. В результате делеции гена *MET15* штамм становился неспособным к росту на среде без добавления органического источника серы, т.е. становился ауксотрофным по цистеину, метионину, гомоцистеину и S-аденозил-метионину. Делеция гена *ECM38* убирала известную  $\gamma$ -глутамилтрансферазную активность. Способность описанного штамма утилизировать экзогенный GSH привела авторов к предположению о существовании дополнительного пути деградации GSH – DUG (Defective in Utilization of Glutathione) (Kumar et al, 2002).

Изучение ферментов альтернативного пути деградации GSH показало, что он протекает в цитоплазме благодаря трем белкам Dug1, Dug2 и Dug3. Белок Dug1, как было описано выше, относится к семейству M20A металлогидролаз и обладает пептидазной активностью по отношению к цистеинил-глицину.

Белок Dug2 состоит из 878 аминокислотных остатков. BLAST анализ выявил, что фермент имеет два разных домена. N-концевой домен (19-366 ак. o.) содержит повтор WD40, представляющий собой последовательность тандемно расположенных повторяющихся единиц, количество которых варьирует (Ganguli et al, 2007). Одна такая единица содержит около 40 аминокислотных остатков и обычно начинается с пары Gly-His, а заканчивается Trp-Asp. Повторы WD40 участвуют во взаимодействии доменов при образовании мультивалентных комплексов больших белков. Через модули WD40 происходит временное взаимодействие двух или более белков, которое необходимо для каталитической активности образованного комплекса (Smith et al. 1999). С-концевая область Dug2 (423–878 ак. о.) имеет гомологию с семейством M20A металлогидролаз (Ganguli et al, 2007).

Белок Dug3 состоит из 357 аминокислотных остатков и содержит N-концевой домен семейства глутамин амидотрансфераз (GATase) класса II, участники которого способны катализировать удаление амминогруппы глутамина с последующим переносом ее на другой субстрат и образованием новой C-N связи (Ganguli et al, 2007).

46

Дальнейшее исследование ферментов альтернативного пути деградации GSH показало, что белки Dug2 и Dug3 образуют деградосомный  $(Dug2p-Dug3p)_2$ с К<sub>м</sub> для GSH 1,2 мМ. комплекс Глутаминамидотрансферазный домен Dug3 содержит остаток цистеина, который является нуклеофилом, необходимым для каталитической активности фермента, a Dug2 посредством димеризации через M20A домены образует гомодимер, служащий платформой для сборки комплекса. Обе субъединицы гомодимера Dug2 взаимодействует с Dug3 через С-концевые домены WD40. После образования активного комплекса (Dug2-Dug3)2, деградосома может связывать GSH, разрывая у-глутамильную связь, с высвобождением глутамата и цистеинил-глицина (Рисунок 6, из Kaur et al, 2012). Предполагают, что триггером для сборки комплекса является голодание по cepe (Kaur et al, 2012).



Рисунок 6 – Деградация GSH комплексом (Dug2-Dug3)2 по Kaur et al, 2012

Существует мнение, что деградация GSH происходит исключительно в цитоплазме клеток *S. cerevisiae* комплексом (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> и является основным путем его катаболизма, а белок Ecm38, локализованный в вакуолях, участвует в деградации конъюгатов GSH (Baudouin-Cornu et al, 2012).

Наличие DUG пути было продемонстрировано в мицелиальных грибах *Aspergillus nidulans* (Spitzmüller et al, 2015) и патогенных дрожжах *Candida albicans* (Desai et al, 2011). Гомологи Dug2 и Dug3 были описаны только в дрожжах и мицелиальных грибах, что указывает на уникальность данных белков для царства грибов (Bachhawat A.K. and Kaur A., 2017).

### 2.6. Субстратная специфичность ферментов у-глутамильного цикла

Многие ферменты обладают широкой субстратной специфичностью, что определяет гибкость метаболических путей и обеспечивает высокую адаптивность микрорганизмов к изменяющимся условиям роста. Как упоминалось выше, различные γ-глутамильные пептиды могут образовываться в результате активности GGT и как побочный продукт действия ферментов биосинтеза GSH GCL и GS, а также некоторых других ферментов. Поэтому, в этой главе мы рассмотрим возможность ферментов GCL, GS и GGT использовать различные субстраты.

### 2.6.1. Субстратная специфичность GCL

Субстратная специфичность GCL *E.coli* в присутствие ионов магния и марганца была детально изучена Kelly с соавторами. Было показано, что ионы  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ , изменяют субстратную специфичность GCL при связывании аминокислотных субстратов и ингибиторов. Субстратная специфичность GCL *E.coli* представлена в Таблице 4. Активность GCL измерялась по скорости образования АДФ. Реакционная смесь для изучения субстратной специфичности в отношении L-глутамата и его аналогов содержала 25 мМ L-а-аминобутирата и 10 мМ АТФ. Реакционная смесь для изучения изучения субстратной специфичности в отношении L-цистеина и его аналогов содержала 25 мМ L-глутамата и 10 мМ АТФ. Концентрации  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  составляли 25мМ и 10 мМ, соответственно (Kelly et al, 2002).

Субстрат	K <sub>m</sub>		
	$Mg^{2+}$	Mn <sup>2+</sup>	$Mg^{2+}/Mn^{2+}$
L-глутамата <sup>а</sup>	1,9±0,2	0,32±0,03	5,9
<b>D</b> -глутамат	75±9	5,9±0,7	12,7
α-метил-L-глутамат	3,9±0,4	0,41±0,07	9,5
α-этил-L-глутамат	18,2±4,9	0,53±0,13	34
<i>N</i> -метил-L-глутамат	27,6±5,2	0,37±0,02	75
L-цистеин <sup>6</sup>	0,1±0,02	0,045±0,004	2,2
S-метил-L-цистеин	8,1±0,5	0,32±0,03	25,3
Глицин	17,6±0,2	1,7±0,2	10,4
L-аланин	21,7±3,6	7,8±2,3	2,8
L- α-аминобутират	3,9±0,4	0,41±0,1	9,5
L-норвалин	61±7	16,3±2,4	3,8
L-норлейцин	33,3±5,6	12,6±4,7	2,7
β-хлоро-L-аланин	0,17±0,04	0,031±0,001	5,5
β-циано-L-аланин	0,28±0,3	0,028±0,004	10
L-серин	24,6±2,8	7,6±1,6	3,2
<i>О</i> -метил-D, L-серин	31,1±2,7	6,1±0,8	5,1
L-треонин	73,9±8,8	114±10	0,65
L-allo-треонин	18,8±2,4	4,4±0,5	4,3
L-C-аллилглицин	6,9±0,6	4,2±0,4	1,6
L-валин	27,1±5,5	21±3	1,3
L-лейцин	57,9±6,4	19±6	3
L-изолейцин	23±7	9,3±1,1	2,4
β-амино- <i>iso</i> -	29,9±2,3	6,1±0,8	4,9
изобутират			

**Таблица 4** – Субстратная специфичность GCL *E.coli* в отношении аналогов L-глутамата и L-цистеина (по Kelly et al, 2002)

изобутират а а присутствии MgCl<sub>2</sub> (40 мМ) или MnCl<sub>2</sub> (4 мМ) аналоги L-глутамата: β-глутамат, R,S-метил-D,L-глутамат, R,S-γ-метил-D,L-глутамат, L-аспартат и D,L-α-аминоадипат показали активность <1%.

<sup>6</sup> – ниже следуют аналоги L-цистеина

Фермент GCL *E.coli* проявляет достаточно узкую субстратную специфичность в отношении аналогов L-глутамата – только D-глутамат, N-метил- и  $\alpha$ -алкилпроизводные показали значительную активность. В целом, замена Mg<sup>2+</sup> на Mn<sup>2+</sup> значительно снижает значения Kм для бедных аналогов L-глутамата. Однако, аналоги неактивные с Mg<sup>2+</sup> также неактивны с Mn<sup>2+</sup>

(Kelly et al, 2002). Следует отметить, что некоторые аналоги L-глутамата, в том числе β-глутамат, β-метилглутамат, γ-метилглутамат и L-α-аминоадипат, являясь бедным субстратом для GCL *E.coli*, проявляют значительную активность с GCL крысы (Sekura and Meister, 1977).

В отличие от узкой субстратной специфичности в отношении аналогов L-глутамата, GCL *E.coli* имеет более широкий спектр взаимодействий с аналогами L-цистеина (Таблица 4). Некоторые аналоги, такие как L-норвалин и  $\beta$ -амино-*iso*-изобутират показали себя бедными субстратами для GCL *E.coli*, однако они являются активными субстратами для GCL млекопитающих (Orlowski and Meister, 1971, Rathbun, 1976b). Как и в случае с аналогами L-глутамата при замене Mg<sup>2+</sup> на Mn<sup>2+</sup> значительно снижаются значения Км для бедных субстратов, таких как L-норлейцин, L-лейцин, L-норвалин и другие (Kelly et al, 2002).

### 2.6.2. Субстратная специфичность GS

Изучение сайтов связывания GS, выделенной из почек крысы, с помощью метильных и других аналогов в качестве субстратов показало, что области связывания для глицина и цистеинильной группы L- $\gamma$ -глутамил-L-цистеина высококонсервативны, тогда как дипептидные субстраты, содержащие L- $\gamma$ -глутамильный остаток, легко заменяются такими аналогами как D- $\gamma$ -глутамил,  $\alpha$ -метил-,  $\beta$ -метил-,  $\gamma$ -метил- и N-метилглутамил,  $\beta$ -аминоглутарил и N-ацетил остатками. Активность GS по отношению к L- $\gamma$ -глутамил аминокислотам определялась по количеству образования NADH в течение 2 минут в реакционной смеси, содержащей 150 мМ Tris HCl, 100 мМ KCl, 5 мМ АТФ, 2,5 мМ ФЕП, 20 мМ MgCl, 0,1 мМ ЭДТА, 5 мМ [<sup>14</sup>C]глицина и соответствующий аналог. Во всех случаях образование [<sup>14</sup>C]трипептида хорошо совпадало (±5%) с общим окислением NADH (Oppenheimer et al, 1979). Данные по ферментативной активности GS по отношению к L- $\gamma$ -глутамил аминокислотам сведены в Таблице 5.

Таблица 5 –	Активность	GS по	отношению	к L-ү-	глутамил	аминокис	лотам
(Oppenheimer	r et al, 1979)						

Субстрат	Активность		
мМ	нМ	Относительная	
L-γ-глутамил-L-α-аминобутират (5)	69,4	[100]	
L-ү-глутамил-L-цистеин (5)	70,7	102	
L-ү-глутамил-L-(S-метил) цистеин (5)	16,6	24	
L-γ-глутамил-D-α-аминобутират (5)	0,7	1	
L-γ-глутамил-DL-α-метил-α-аминобутират (10)	0	0	
L-γ-глутамил-DL- <i>N</i> -метил-α-аминобутират (10)	0	0	
L-γ-глутамил-DL-β-аминобутират (10)	1,5	2	
L-γ-глутамил-DL-β-аминоизобутират (10)	0	0	
L-ү-глутамил-L-серин (5)	53,5	77	
L-ү-глутамил-глицин (5)	5,3	8	
L-ү-глутамил-L-аланин (5)	38,5	55	
L-ү-глутамил-L-норвалин (5)	6,3	9	
L-ү-глутамил-L-норлейцин (5)	0,5	1	
L-ү-глутамил-L-валин (5) <sup>а</sup>	0	0	

<sup>а</sup> – L-гамма-глутамильные пептиды, содержащие L-изолейцин, L-аспарагин, L-пролин, L-фенилаланин, L-лизин, L-метионин, D-метионин и глицилглицин были также неактивными субстратами.

Активность GS по отношению к аминокислотному остатку во втором положении определялась в реакционной смеси, содержащей 50 мМ глицина или его аналогов по образованию АД $\Phi$  (Oppenheimer et al, 1979). Данные по ферментативной активности GS по отношению к глицину и его аналогам сведены в Таблице 6.

**Таблица 6** – Активность GS по отношению к глицину и его аналогам (по Oppenheimer et al, 1979)

Субстрат	Активность	
мМ	нМ	Относительная
глицин	39	[100]
аминоксиацетат	20,7	53
<i>N</i> -гидроксиглицин	12,9	33
аминометансульфонат	$0^{a}$	0
саркозин	0	0
L-аланин	0	0
D-аланин	0	0
β-аланин	0	0
глицинамид	0	0

<sup>а</sup> – при концентрации 400 нМ активность по отношению к аминометансульфонату была 7 %

Большинство высших растений содержит GSH, который выполняет присущие ему основные функции, но в некоторых, экономически важных сельскохозяйственных культурах, он отсутствует и полностью, или частично заменен другими необычными тиольными соединениями. Например, в сортах бобовых, включая сою (*Glycine maxL*.), hGSH (гомоглутатион, ИЛИ  $\gamma$ -глутамил-L-цистеинил- $\beta$ -аланин) является доминирующим тиолом (Klapheck, 1988). Очищенная рекомбинантная глутатионсинтетаза из соевых бобов показала в 6 раз более высокую специфическую активность по к  $\beta$ -аланину, чем к глицину (K<sub>m</sub> 0,32±0,08 отношению И 19±6. соответственно) (Skipsey et al, 2005).

#### 2.6.3. Субстратная специфичность GGT

Сайт связывания субстратов ү-глутамилтрансферазы можно условно разделить на три области, в соответствии с составляющими GSH аминокислотами, – участки связывания ү-глутамильной группы, остатков цистеина и глицина (Thompson and Meister, 1977, 1979).

ү-Глутамилтрансфераза обнаруживает широкую субстратную специфичность по отношению к ү-глутамильным субстратам. Особая

вариабельность проявляется во втором положении, т.е. в области связывания, соответствующей цистеинильному остатку GSH. Некоторые S-конъюгаты GSH и γ-глутамил-*p*-нитроанилид, широко используемые в качестве донорных молекул γ-глутамильного остатка при измерении ферментативной активности γ-глутамилтрансферазы, проявляют большую активность, чем сам GSH (Tate, 1975, McIntyre and Curthoys, 1979). Донорами γ-глутамильной группы могут выступать как L-, так и D-изомеры γ-глутамильных соединений (Taniguchi and Ikeda, 1998). Такая широкая субстратная специфичность GGT дает возможность ферменту принимать участие в метаболизме большого числа S-глутатионовых конъюгатов ксенобиотиков.

В качестве акцепторов GGT предпочитает L-изомеры нейтральных аминокислот, таких как цистин, метионин, глутамин, аланин и серин в качестве свободной аминокислоты или на месте первого остатка дипептида (Thompson and Meister, 1977). Аминокислоты с разветвленными цепями относительно слабые акцепторы GGT, а D-изомеры и L-пролин абсолютно не активны в качестве субстратов (Tate and Meister, 1985). Определение относительной активности GGT при выборе остатка во втором положении дипептидов показало, что наиболее предпочтительным аминокислотным остатком является глицин (Thompson and Meister, 1977).

# 2.7. Особенности конструирования штаммов *S. cerevisiae* для пищевой промышленности

Человечество эксплуатирует традиционные процессы брожения дрожжей уже несколько тысячелетий для получения вина, пива и хлеба. В настоящее время дрожжи используют для производства кормового и пищевого белка, витаминов, ферментов, органических кислот, незаменимых аминокислот, усилителей вкуса и других биологически активных веществ, а также применяют в индустрии здорового питания в качестве вкусоароматической добавки. Современные научные достижения позволяют выделение, конструирование и производство в промышленных масштабах

53

новых штаммов дрожжей, удовлетворящих специфическим требованиям пищевой промышленности (Becatorou et al, 2006).

Штаммы-продуценты микроорганизмов являются основой промышленной биотехнологии. Для их конструирования используют методы метаболической инженерии и комбинаторные методы мутагенеза и отбора. Современные штаммы обычно не содержат плазмид И маркеров антибиотической устойчивости, а генетическая инженерия проводится методами гомологичной и сайт-специфичной рекомбинации. К штаммам, используемыем в пищевой промышленности, предъявляются особо высокие безопасности – они не должны быть требования ПО генетически модифицированы (non-GMO). Однако, в некоторых странах, например, в Японии, штаммы-продуценты, сконструированные без внесения чужеродной ДНК («self-cloning») штаммы) имеют статус генетически не модифицированных (Akada, 2002). Поэтому, использование принципов «selfcloning» при конструировании штаммов-продуцентов может способствовать получению официального разрешения на их использование в пищевой промышленности (Steensels et al, 2014).

Традиционно используемым методом для удаления из генома нежелательной ДНК в *S. cerevisiae* является система селекции-контрселекции, основанная на использовании маркера  $URA3^+$  и 5-ФОА (5-фторооротовая кислота) (Воеке et al, 1984, 1987). Штаммы дрожжей, содержащие интактный ген *URA3*, не способны расти в присутствии 5-ФОА и соответственно штаммы, в которых ген *URA3* инактивирован, не чувствительны к 5-ФОА. Комбинирование гомологичной рекомбинации с такой системой селекцииконтрселекции дает возможность вводить любые последовательности с последующим удалением остатков плазмид или чужеродной хромосомной ДНК (Rothstein, 1991, Sikorski and Boeke, 1991).

Пионерами в использовании описанной системы для делеций генов в S. cerevisiae с возможностью многократного использования маркера URA3 были Alani с соавторами (Alani et al, 1987). Авторы создали генетическую конструкцию, в которой ген URA3 был фланкирован прямыми повторами бактериальной последовательности hisG длиной 1,1 т.п.н. После введения подобной конструкции в геном и последующей селекции на 5-ФОА происходило удаление URA3 посредством гомологичной рекомбинации между фрагментами hisG, в результате которой, в геноме оставалась одна последовательность hisG (Рисунок 7).



**Рисунок** 7 – Удаление гена *URA3*, фланкированного прямыми повторами *hisG* (рисунок по Alani et al, 1987)

Элегантный метод «бесшовного» удаления генов с использованием системы селекции-контрселекции *URA3*<sup>+</sup> и 5-ФОА был предложен Akada (Рисунок 8).



**Рисунок 8** – Делеция гена *HIS3* с использованием системы селекции-контрселекции *URA3*<sup>+</sup> и 5-ФОА по Akada et al, 2006

Делеция гена *HIS3* была проведена конструкцией, полученной ПЦР с помощью праймеров, один из которых содержал 40 нуклеотидов гомологичных последовательности, прилегающей к целевому гену. При интеграции такой конструкции в заданный локус генома происходила делеция гена *HIS3* и одновременное введение последовательности длиной 40 нуклеотидов для последующего удаления маркера *URA3*.

После контрселекции на 5-ФОА происходило «вырезание» гена URA3 посредством гомологичной рекомбинации между расположенными в

одинаковой ориентации введенными 40 нуклеотидами и прилегающей к удаленному гену *HIS3* последовательностью (Рисунок) (Akada et al, 2006).

Существенным недостатком системы URA3<sup>+</sup> и 5-ФОА является необходимость инактивации гена URA3 в хозяине, а промышленные штаммы-продуценты часто полиплоидны и прототрофны. Поэтому, эта система чаще используется для лабораторных гаплоидных штаммов (Hirosawa et al, 2004).

В настоящее время в генной инженерии как многоклеточных, так и одноклеточных организмов, успешно применяют методы редактирования генома, основанные на использовании CRISPR-Cas9 системы. Данная система состоит из gRNA (направляющая PHK), последовательность которой гомологична ДНК-мишени в геноме и задается исследователем, И эндонуклеазы Cas9, которая вводит двухцепочечный разрыв в заданную последовательность, обычно длиной 20 нуклеотидов. Обязательным условием распознавания мишени ферментом Cas9 является наличие РАМ (protospacer adjacent motif мотив, смежный с протоспейсером), расположенного непосредственно за последовательностью гомологичной gRNA на 3'-конце целевого локуса ДНК (Рисунок 9 из DiCarlo et al, 2013).



**Рисунок 9** – Схема разрезания Cas9 мишени перед РАМ последовательностью по DiCarlo et al, 2013

Каждый ортолог Cas9 узнает уникальную последовательность РАМ. Например, для *Streptococcus pyogenes* Cas9 это NGG (где N – любой нуклеотид) (Ran et al, 2013).

Репарация двуцепочечного разрыва, произведённого Cas9, может проводиться как за счёт негомологичного соединения концов, так и путём гомологичной рекомбинации. В результате соединения концов негомологичной рекомбинацией часто возникают небольшие вставки или делеции, способные разрушить рамку считывания белок-кодирующих генов с последующей утратой их функций. Образование множества двуцепочечных разрывов может приводить к появлению крупных делеций и даже инверсий (Sontheimer and Barrangou, 2015). Репарация посредством гомологичной рекомбинацией подразумевает под собой замену поврежденной ДНК новой последовательностью с комплементарными областями выше и ниже разрыва, веденного белком Cas9. Таким образом, гомологичная рекомбинация позволяет исследователю вводить дополнительные аллели генов и изменять их экспрессию, вводить и удалять мутации и т.д. (Wilkinson and Wiedenheft, 2014).

Технология редактирования генома на основе CRISPR-Cas9 предлагает новый инструментарий для модификации промышленных дрожжей *S. cerevisiae*. Например, недавно был сконструирован винный штамм дрожжей *S. cerevisiae*, в котором инактивировали ген *CAN1*, кодирующий аргининовую пермеазу. Наличие данного белка в активном состоянии приводит к повышенному образованию мочевины дрожжами, а мочевина, в свою очередь, является основным предшественником для образования этилового эфира карбаминовой кислоты, который относится к канцерогенам (Vigentini et al, 2017).

В то время как технологии, основанные на CRISPR, демонстрируют широкий спектр потенциальных применений и относятся к «self-cloning», законодательство, касающееся использования цисгенных генноотредактированных организмов, сильно различается в разных странах

58

планеты. В недавнем постановлении ЕС говорится, что организмы, к которым была применена технология CRISPR-Cas, должны следовать тем же руководящим принципам, что и другие генетически модифицированные организмы. Однако, такие страны как Бразилия, США, Япония и Аргентина установили конкретные руководящие принципы, которые, в некоторых случаях, позволяют считать организмы, измененные с помощью CRISPR-Cas, как генно-немодифицированные (Mertens et al, 2019).

Как и любой метод, система CRISPR-Cas имеет свои достоинства и недостатки. К существенному недостатку можно отнести неспецифическую активность CRISPR-Cas в нецелевых участках генома (off-target сайты). Было показано, что помимо высокой сайт-специфичной активности, комплекс Cas9-gPHK способен вносить разрыв в ДНК при наличии РАМ и неполной гомологии с gPHK вплоть до 3-5 несовпадающих нуклеотидов (Cong et al, 2013, Hsu et al, 2013, Pattanayak et al, 2013). Кроме того, если репарация двухцепочечного разрыва происходит за счет негомологичной рекомбинации, необходимость лигирования таких разрывов требует обработки свободных концов ДНК эндонуклеазами и заполнения одноцепочечных участков полимеразой, что может приводить к потере и вставке нуклеотидов, а также к нуклеотидным заменам. Частота Cas-9-обусловленного мутагенеза составляет несколько десятков процентов (Geisinger et al, 2016).

Также, отрицательным моментом для применения системы CRISPR-Cas является необходимость приобретения патента для использования ее при конструировании промышленных штаммов-продуцентов.

### 3. Материалы и методы

### 3.1. Среды

Для культивирования штаммов дрожжей использовали полноценную питательную среду YPD, минимальнуые среды SD и SDP (Sherman, 2002). Состав сред, использованных в настоящей работе, приведен в Таблице 7.

Среда	Состав
VDD	Дрожжевой экстракт (10 г/л), пептон (20 г/л), глюкоза
IFD	(20 г/л)
SD	Дрожжевые азотные основания без аминокислот (6,7
3D	г/л), глюкоза (20 г/л)
SDD	Дрожжевые азотные основания без аминокислот и
SDP	аммония (0,67 г/л), глюкоза (20 г/л), пролин (1г/л)
SD+V	SD с добавлением валина (1 г/л)
SD+V+G	SD с добавлением валина (1 г/л) и глицина (1 г/л)
SD+γ-EVG	SD с добавлением ү-EVG (100 мг/л)
SD+γ-EV	SD с добавлением ү-EV (100 мг/л)
SD+VG	SD с добавлением VG (100 мг/л)

Таблица 7 – Среды, использованные в данной работе

Для получения агаризованных сред добавляли бакто-агар до конечной концентрации 2%. Антибиотики и ауксотрофные добавки использовали в следующих концентрациях: генетицин (G418) – 200 мг/л, флеомицин – 7,5 мг/л, урацил – 20 мг/л. Для отбора на прототрофность по урацилу использовали минимальную среду. Контрселекцию по *URA3* проводили на SD с добавлением 5-фторооротовой кислоты 1 мг/л и урацила 20 мг/л.

## 3.2. Условия культивирования и пробоподготовка для анализа γ-EVG, γ-EV и VG пептидов

Количественное измерение пептидов γ-EVG, γ-EV и VG в исследуемых штаммах проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС/МС), как описано в (Nishiuchi et al, 2010), но с некоторыми

модификациями. Ночную культуру исследуемого штамма засевали в пробирки диаметром 20 мм с 5 мл ферментационной среды с начальной оптической плотностью 0,03 – 0,2 и выращивали с аэрацией при 30°C до оптической плотности 1,5 – 3,5. При достижении определенной оптической плотности, пробирки охлаждали на льду в течение 10-20 минут. После 2 ИЗ ΜЛ культуральной жидкости охлаждения клетки осаждали центрифугированием в охлажденной центрифуге и дважды отмывали ледяной деионизированной водой. Для экстракции пептидов, клетки суспендировали в 1 мл деионизированной воды и термостатировали 10 минут 70°C на водяной бане. После экстракции, при клетки осаждали центрифугированием при комнатной температуре, надосадочную жидкость отбирали и проводили очистку от высокомолекулярных пептидов с помощью ацетонитрила. Для этого брали 1 объем водного экстракта, смешивали его с 4 объемами ацетонитрила и инкубировали при комнатной температуре 20 После осаждения высокомолекулярных минут. пептидов смесь центрифугировали 20 минут, отбирали супернатант и упаривали его в вакуумном испарителе.

Анализ образцов методом ВЭЖХ/МС/МС проводился на коммерческой основе в ЦКП научно-исследовательского института биомедицинской химии им. Ореховича на приборе HPLC Agilent 1200 с колонкой Thermo Hypersil-Keystone C18 100 мм \* 2.1 мкм \* 5 мкм, сопряженным с масс-спектрометром Triple Quadrupole Agilent 6410, и в АО «АГРИ» на приборе Acquity UPLC, сопряженным с масс-спектрометром Waters Xevo TQD. Ионы для определения пептидов MS/MS представлены в Таблице 8.

Пептид	Исходный ион	Ион-продукты
γ-EVG	474	171, 304, 229
γ-ΕV	417	171, 247, 184
VG	345	171, 270, 242

Таблица 8 – Ионы для определения пептидов MS/MS

В качестве стандартов использовались γ-EV, VG и γ-EVG высокой степени чистоты. γ-EV, VG были приобретены в Bachem AG (Швейцария), γ-EVG был синтезирован Kokusan Chemical Co., Ltd (Япония).

### 3.3. Условия культивирования и определение концентрации GSH

Способность штаммов образовывать GSH оценивали количественно после выращивания в пробирках диаметром 20 мм с 2 мл ферментационной среды в течение 18 часов с аэрацией при +30°С. По окончании культивирования, пробирки охлаждали на льду в течение 10-20 минут. После культуральной охлаждения. клетки 1 ΜЛ жидкости ИЗ осаждали центрифугированием в охлажденной центрифуге и дважды отмывали водой. ледяной деионизированной Для экстракции GSH, клетки суспендировали в 1 мл деионизированной воды и термостатировали 10 минут при 70°C на водяной бане. После экстракции, клетки осаждали центрифугированием при комнатной температуре и надосадочную жидкость отбирали для анализа.

Анализ образцов, содержащих GSH, проводился методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Agilent 1260 (Agilent Technologies, США) с флуориметрическим детектором аналитической группой AO «АГРИ». Разделение проводилось на хроматографической колонке Waters Spherisorb S3 ODS2 2,0 х 150 мм с предварительной реакцией дериватизации с 4-фтор-7-сульфамоилбензофуразаном для регистрации сигнала. В качестве стандарта использовался GSH высокой степени чистоты («Sigma»).

# **3.4.** Условия проведения ПЦР в реальном времени и измерения активности ферментов

Общая РНК клеток для проведения количественной ПЦР выделялась из трех независимо выращенных культур каждого штамма по протоколу,

описанному в (Collart and Oliviero, 1993). Обратную транскрипцию осуществляли с использованием набора для синтеза RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) и праймера oligo(dT)<sub>18</sub> кДНК Н-минус первой цепи RevertAid (Thermo Fisher Scientific). Количественная ПЦР проводилась на термоциклере ANK32 (Синтол, Москва) с использованием 2.5x SYBR Green qPCR kit M-423 (Синтол, Москва).

Активность Gsh1 измерялась с использованием неочищенных клеточных экстрактов по методике, описанной в (Kistler et al, 1990), с некоторыми модификациями. Активность фермента оценивалась по количеству образуемого γ-GC. Объем реакционной смеси был 200 мкл. Реакция останавливалась добавлением 100 мкл этанола, после чего белки удалялись центрифугированием. Надосадочная жидкость разбавлялась в 10 раз водой и содержание γ-GC определялось ВЭЖХ в соответствии с методикой, описанной в (Nishiuchi et al, 2013).

Активность Gsh2 определялась так же, как активность Gsh1, только в качестве субстратов использовались γ-GC и глицин. Активность фермента оценивалась по количеству образуемого GSH, которое определялось с помощью ВЭЖХ в соответствии с процедурой, описанной в (Nishiuchi et al, 2013).

### 3.5. Эксперименты с рекомбинантной ДНК

Генно-инженерные манипуляции, выделение хромосомной и плазмидной ДНК, LiAc-зависимую трансформацию *S. cerevisiae* проводили в соответствии с общепринятыми протоколами (Becker and Lundblad, 1997, Sherman, 2002). Рестрикцию, лигирование, электрофорез ДНК в 0,8% агарозном геле, Ca<sup>2+</sup>-зависимую трансформацию клеток *E. coli* осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами (Sambrook and Russel, 2001). В работе использовались коммерчески доступные препараты рестриктаз, Т4 ДНК-лигазы и фрагмента Кленова ДНК

полимеразы I *E. coli* (Fermentas, Литва). Плазмиды из клеток *E. coli* выделялись с использованием набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Германия).

ПЦР проводилась на амплификаторе «Perkin-Elmer 2400 GeneAmp PCR System» с использование ДНК полимераз High Fidelity («Thermo Fisher Scientific», США) и Taq («Fermentas», Литва). Условия для проведения ПЦР подбирались в соответствии с прилагаемыми инструкциями производителя с учетом характеристик олигонуклеотидных праймеров и структуры матричной ДНК. Химический синтез олигонуклеотидных праймеров выполнялся фирмой «Синтол» (Москва, Россия) на коммерческой основе. Структура нуклеотидных последовательностей праймеров приведена в Таблице 9.

**Таблица 9** – Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в данной работе

1	
Олигонуклеотид	Структура 5'→3'
adh1L1	atttcggatatccttttgttgtttc
adh1R1	tgtatatgagatagttgattgtatg
GSH1-PADH1	tcgagtcacttgtagaagctgaaaattgagcagatttagt-
	atttcggatatccttttgttgtttc
PADH1-GSH1	caaaccactgcaaaggcgtgcccaaagctaagagtcccat-
	tgtatatgagatagttgattgtatgc
GSH1-51	aatggcgacagcctattg
GSH1-31	agettetacaagtgaetega
GSH2up2	ccacatcttctaatatggat
GSH2d_tail	ctttcttcctataattgctt
GSH2- P <sub>ADH1</sub>	aggtagcaaagtgccacttcaagcaattataggaagaaag-
	atttcggatatccttttgttgtttc
P <sub>ADH1</sub> -GSH2	attcattcaattgatccttggaaggtggatagtgtgccat-
	tgtatatgagatagttgattgtatgc
ADH1up	tacaacactggaaatggttg
ura3up2	gaggctactgcgccaatt
ura3d2	gaagtcattgacacagtctgtga
GSH2Km-L1	atggcacactatccaccttccaaggatcaattgaatgaat
	ccatccttttgttgtttccgggtgta
GSH2Km-R2	ctagtaaagaataatactgtccaaacatccgaatcctgcc-
	tcagaagaactcgtcaagaaggcgat
GSH2U	taaatgtctcccaaatcaac

GSH2d	agcaaatttatgtagaagtgt
PTR2-PADH1	aaggtataccacagtgctgctccactgcaa-atttcggatatccttttgttgtttc
PADH1-PTR2	cctgagcatcatctgagccttggctgggatggttgagcat-
	tgtatatgagatagttgattgtatgc
ptr52	ggetgetteteceetttea
ptr32	ttgcagtggagcagcact
ptr2-31	cccgtcaacgtaatatgg
Dug1-pUG72up	gaatctcccttcattgttagttcagttgctccagagcatcgtacacaagc-
	cagetgaagettegtaege
Dug1-pUG72d	cttgaatgacatggaatttacacatatatacacatatataaataa
	gcataggccactagtggatctg
GSH1-UG-up	acattgtagggtggtttagagtatcgaaaatatacatatagaagaataaa-
	cagetgaagettegtaege
GSH1-UG-d	cccaaatcgataatgtcaactttctttcacaaccgaagtaaaaggagt-
	gcataggccactagtggatctg
ECM38-UGup	aaaaagacaagacaaaagtagcgtactagactta-
	cagttcgctgaagcttcgtacgc
ECM38-UGd	tatettgaactatattacagtaccattettaccccacate-
	gcataggccactagtggatctg
Dug2-loxPup	cgaacaaccctgtaaggaaaagtgaaaaacgagggcagaagtaattgtgaa
	atc-gtcgacaacccttaatataac
Dug2-loxPd	a catatg caa attg gg tatatatta a g cacttt a a a a t caattg ttg tag ttg t-
	ctagtggatctgatatcacc
dug1-51	cggctacaagaaaatgtgtcaaaa
dug1-31	agttttctgtttttcctctcttttcaga
GSH1U	tetegagteaettgtagaagetg
GSH1d	aataaatggtcacgttggcat
ECM38up	gagggaacataacggcatt
ECM38d	ctgcaaggtagggaaactt
DUG2up	tgctgcaattagaagttcaatg
DUG2d	ggttggagcttttatacgcctt
DUG2-URA3K1	aggaaaagtgaaaaacgagggcagaagtaattgtgaaatc-
	cgagagetegttttatttag
Ura3Kl-d.r	caattgtttgtagttgt-
DUG2_tail	taattcagttacacacattttattgatattggtgccacag-acgtgatcttttgtaa
DUG2d-2	attaggtagaggcctacatatgcaaattgggtatatattaagcactttaaaat-
	caattgtttgtagttgt
PDC1-PADH1	ttgcataatattgtccgctg-atttcggatatccttttgtt
GSH2-PDC1	tacataaaaatgcttataaaactttaactaataattagagattaaatcgc-
	ctagtaaagaataatactgt
pdc1-F	caagcaaggcagaaactaac
PDC1_tail	cagcggacaatattatgcaa
pdc1-R	cttggttccactaattcatc

hgt1-pUG6u	ggaaagccaaaaattcgacaggcattccatacaggaggaaggtctcg-
	cagetgaagettegtaege
hgt1-pUG6d	ttgccacacctgcttcaacaccggcccccatgacgaaattgtac-
	gcataggccactagtggatctg
hgt1-51	ttaatcacatcaaacccactgc
hgt1-31	gctaaatattgcaggggtcg
PADH1-HGT1	ccgactccaacgagtcgctctccctataaatggtactcat-
	tgtatatgagatagttgattgtatgc
HGT1-PADH1	attcaatgaattgtttcgactatatatggacaatcatcgg-
	atttcggatatccttttgttgtttc
hgt53	gatcgatactaacttccgagac
hgt33	ccgatgattgtccatatatagt

Плазмиды для ПЦР-амплификации делеционных кассет были получены в EUROSCARF (Germany). Плазмиду pKS-URA3-PADH1-LR, которую использовали в качестве матрицы для синтеза кассет для замены промоторных областей исследуемых генов, получили в несколько этапов описанным ниже образом. Плазмиды, использованные в данной работе, приведены в Таблице 10.

Таблица 1	<b>10</b> – Плазмиды.	использованные в	ланной	работе
			A	p

Плазмида	Описание	Происхождение	
		(ссылка)	
pUC19AOX-	G418 <sup>R</sup> . солержит ген устойчивости к	Дмитрии	
G418-BRI	Геницитину	Козлов, НИИ	
		«Генетика»	
pBluescript II	Ар <sup>r</sup> , содержит ген устойчивости к	C	
KS(+)	ампициллину	Stratagene	
pUC19	Ар <sup>г</sup> , содержит ген устойчивости к	Invitrogon	
poers	ампициллину	mvnuogen	
	Ар <sup>г</sup> , получена клонированием в <i>Sma</i> I		
pKS-URA3-13	сайт плазмиды pBluescript II KS(+)	Данная работа	
	фрагмента Sc URA3 длиной 1,6 т.п.н.		
	$Ap^{r}$ , получена клонированием в <i>Hind</i> III		
pKS-URA3-H	сайт плазмиды pBluescript II KS(+)	Данная работа	
1	фрагмента Sc URA3 длиной 1,16 т.п.н.		
pUC19-PADH1	Ар <sup>г</sup> , содержит модуль Р <sub>АНD1</sub> - ScURA3	Данная работа	
pUC19-P <sub>ADH1</sub> -	$A \sigma^{r}$	Ποτιτο στο ο διο πο	
$URA3$ Ар, содержит модуль $P_{AHDI}$ - ScURA3		данная работа	
pKS-URA3-	Ар <sup>г</sup> , содержит модуль Р <sub>АНD1</sub> - ScURA3-	Данная работа	

Плазмида	Описание	Происхождение (ссылка)
PADH1-LR	P <sub>ADH1</sub>	
pUG72	URA3+, содержит модуль loxP- K1 <i>URA3-</i> loxP	EUROSCARF
pUG6	G418 <sup>R</sup> , содержит модуль loxP-kanMX- loxP	EUROSCARF
pUG66	ble <sup>R</sup> , содержит модуль loxP-ble-loxP	EUROSCARF
pAG61	URA3+, содержит модуль Agleu2- Ca <i>URA3</i> -Agleu2	EUROSCARF

### 3.5.1. Конструирование плазмиды pKS-URA3-PADH1-LR

Плазмида pKS-URA3-13 была получена клонированием фрагмента хромосомной ДНК штамма S288C, синтезированного с помощью ПЦР и праймеров ura3up2 и ura3d2, несущего ген URA3 с собственной регуляторной областью длиной 1,6 т.п.н., в SmaI сайт плазмиды pBluescript II KS(+) (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Схема конструирования плазмиды pKS-URA3-13

Плазмида pKS-*URA3*-Н была получена путем клонирования фрагмента HindIII-HindIII (1,16 т.п.н.), вырезанного из плазмиды pKS-*URA3*-13, в плазмиду pBluescript II KS(+), обработанную рестриктазой HindIII (Рисунок не приводится).

Плазмида pUC19-P<sub>ADH1</sub> была получена клонированием в SmaI сайт плазмиды pUC19, синтезированного с помощью ПЦР и праймеров adh1L1 и adh1R1, фрагмента ДНК, содержащего промоторную область гена *ADH1* длиной 0,7 т.п.н. (Рисунок 11).



Рисунок 11 – Схема конструирования плазмиды pUC19-P<sub>ADH1</sub>

Создание целевой рекомбинантной плазмиды pKS-*URA3*-P<sub>ADH1</sub>-R,L осуществлялось в два этапа (Рисунок 12). На первом этапе фрагмент промотора гена *ADH1* длиной 700 п.н. был вырезан из плазмиды pUC19-P<sub>ADH1</sub> посредством последовательной обработки Bsp1407I, фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I и KpnI и субклонирован в плазмиду pKS-*URA3*-H последовательно обработанную SalI, фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I и KpnI. В результате была получена плазмида pKS-*URA3*-P<sub>ADH1</sub>, на которой фрагмент промотора гена *ADH1* длиной 700 п.н. располагался справа от гена

*URA3.* На втором этапе плазмида pUC19-P<sub>ADH1</sub> была последовательно обработана BstZ17I, фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I и XbaI. Полученный фрагмент промотора гена *ADH1* длиной 550 п.н. субклонировали в плазмиду pKS-*URA3*-P<sub>ADH1</sub> последовательно обработанную EcoRI, фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I и XbaI. Таким образом, на сконструированной плазмиде pKS-*URA3*-P<sub>ADH1</sub>-R,L маркерный ген *URA3* был фланкирован тандемно расположенными фрагментами промотора гена *ADH1*.



Рисунок 12 – Схема конструирования плазмиды pKS-URA3-P<sub>ADHI</sub>-R,L

### 3.6. Штаммы, использованные в данной работе и их конструирование

Штаммы, использованные в данной работе, были сконструированы на базе лабораторного штамма *S. cerevisiae* S288C. Для эксперимента по исследованию пептидаз, обладающих активностью по отношению к VG, использовали делеционную коллекцию штаммов BY4741 (Invitrogen Life Technologies Ltd., №95401.Н2). Штаммы, использованные в данной работе, приведены в Таблице 11.

Штамм	Генотип	Ссылка или источник
S288C (WT)	MATa SUC2 mal mel gal2 CUP1 flo1 flo8-1 hap1	NBRC
SOA4 (WT)	S288C $ura3\Delta0::P_{ADHI}$ -kanR	Коллекция лаборатории
DAG29 (WT)	S288C <i>ura3</i> ∆227:: <i>loxP</i>	Коллекция лаборатории
$gsh2\Delta$	S288C $gsh2\Delta0::P_{ADHI}$ -kanR	Данная работа
P <sub>ADH1</sub> -GSH2	SOA4 P <sub>ADH1</sub> -GSH2	Данная работа
P <sub>ADH1</sub> -PTR2	SOA4 P <sub>ADH1</sub> -PTR2	Данная работа
$\begin{array}{c} P_{ADHI}\text{-}PTR2\\ dug1\Delta \end{array}$	SOA4 $P_{ADHI}$ -PTR2 dug1 $\Delta$ 0::loxP-KlURA3-loxP	Данная работа
$\frac{P_{ADHI}-PTR2}{gsh1\Delta}$	SOA4 $P_{ADHI}$ -PTR2 gsh1 $\Delta 0$ ::loxP-KlURA3-loxP	Данная работа
$\begin{array}{c} P_{ADHI}\text{-}PTR2\\ ecm38\Delta \end{array}$	SOA4 $P_{ADHI}$ -PTR2 ecm38 $\Delta$ 0::loxP-KlURA3- loxP	Данная работа
$\begin{array}{c} P_{ADHI}\text{-}PTR2\\ dug2\Delta \end{array}$	SOA4 $P_{ADHI}$ -PTR2 dug2 $\Delta$ 0::loxP-KlURA3-loxP	Данная работа
$gsh1\Delta$	S288C gsh1 $\Delta 0$ :: $P_{ADH1}$ -kanR	Данная работа
$ecm38\Delta$	DAG29 ecm38∆0::loxP-KanMX-loxP	Данная
$gsh1\Delta$	$gsh1\Delta0::loxP$ -KlURA3-loxP	работа

Таблица 11 - Штаммы, использованные в данной работе

Штамм	Генотип	Ссылка или источник
$dug2\Delta gsh1\Delta$	DAG29 $dug2\Delta 0 gsh1\Delta 0::loxP$ -KanMX-loxP	Данная работа
$gsh1\Delta$	DAG29 $ecm38\Delta0::loxP-KanMX-loxP$	Данная
$dug2\Delta$	bleMX-loxP	работа
ecm38∆	DAG29 ecm38∆0::loxP-KanMX-loxP	Данная
$dug2\Delta$	$dug2\Delta0::loxP-KlURA3-loxP$	работа
$P_{ADH1}$ -GSH1 ecm38 $\Delta$	SOA4 P <sub>ADH1</sub> -GSH1 dug2 $\Delta$ 0::loxP-KlURA3- loxP ecm38 $\Delta$ 0::loxP-bleMX-loxP	Данная работа
$P_{ADHI}$ -GSH1	SOA4 P <sub>ADH1</sub> -GSH1	Данная работа
P <sub>ADH1</sub> -GSH1 P <sub>ADH1</sub> -GSH2	SOA4 P <sub>ADH1</sub> -GSH1 P <sub>ADH1</sub> -GSH2	Данная работа
$P_{ADHI}$ -GSH1 2x $P_{ADHI}$ - GSH2	SOA4 $P_{ADHI}$ -GSH1 $P_{ADHI}$ -GSH2 $pdc1\Delta0::P_{ADHI}$ -URA3- $P_{ADHI}$ -GSH2	Данная работа
$opt1\Delta$	DAG29 hgt1\(\Delta 1981::Agleu2-CaURA3-Agleu2	Данная работа
P <sub>ADH1</sub> -OPT1	SOA4 P <sub>ADH1</sub> -URA3-P <sub>ADH1</sub> -OPT1	Данная работа
BY4741	S288C his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0	Invitrogen
$aap1\Delta$	BY4741 $aap1\Delta0::kan$ MX	Invitrogen
$dap2\Delta$	BY4741 $dap2\Delta 0::kan$ MX	Invitrogen
$ecm14\Delta$	BY4741 $ecm14\Delta0::kan$ MX	Invitrogen
$omal\Delta$	BY4741 $oma1\Delta0::kanMX$	Invitrogen
$dug1\Delta$	BY4741 $dug1\Delta 0$ :: $kan$ MX	Invitrogen
$sdd3\Delta$	BY4741 sdd3∆0::kanMX	Invitrogen
$yta12\Delta$	BY4741 yta12 $\Delta 0$ ::kanMX	Invitrogen
$prc1\Delta$	BY4741 <i>prc1</i> Δ0:: <i>kan</i> MX	Invitrogen
$lap3\Delta$	BY4741 <i>lap3</i> Δ 0:: <i>kan</i> MX	Invitrogen
$dug3\Delta$	BY4741 dug3∆0::kanMX	Invitrogen
$pep4\Delta$	BY4741 $pep4\Delta 0::kan$ MX	Invitrogen
$pim1\Delta$	BY4741 $pim1\Delta0::kan$ MX	Invitrogen
prb1 $\Delta$	BY4741 prb1 $\Delta 0$ ::kanMX	Invitrogen
$cym1\Delta$	BY4741 $cym1\Delta0::kanMX$	Invitrogen

Штамм	Генотип	Ссылка или источник
$kex1\Delta$	BY4741 $kex1\Delta0::kanMX$	Invitrogen
$ape3\Delta$	BY4741 $ape3\Delta0::kanMX$	Invitrogen
$dug2\Delta$	BY4741 $dug2\Delta 0$ :: $kan$ MX	Invitrogen

Для создания генно-инженерных конструкций и поддержания плазмид использовали штамм *E.coli* DH5α.

Штаммы с инактивированными генами, за исключением штамма  $opt1\Delta 0$ , были получены путем замены кодирующей рамки кассетой типа loxP-маркер-loxP согласно методу (Güldener et al, 1996).

Для замены регуляторных нативных областей в данной работе, мы использовали плазмиду pKS-*URA3*-P<sub>ADHI</sub>-L,R в качестве матрицы для амплификации кассет. Схема синтеза конструкции для замены промоторов приведена в разделе Результаты и обсуждение.

Штамм *P<sub>ADH1</sub>-GSH1* был получен заменой промоторной области гена GSH1 на регуляторную область гена ADH1 в штамме SOA4. Для амплификации модуля  $P_{AHDI}$ -URA3- $P_{ADHI}$ использовали праймеры GSH1- P<sub>ADH1</sub> и P<sub>ADH1</sub>-GSH1 и плазмиду pKS-URA3-PADH1-LR в качестве матрицы. Область «upstream» от промоторной области гена GSH1 получали с помощью праймеров GSH1-51 и GSH1-31 и хромосомной ДНК в качестве матрицы. Кассета для замены промотора гена GSH1 была получена ПЦР-амплификацией с использованием праймеров GSH1-51 и Р<sub>АDH1</sub>-GSH1. В качестве матриц для синтеза конечной конструкции были взяты ПЦР-продукты: модуль  $P_{AHDI}$ -URA3- $P_{ADHI}$  и область «upstream» гена GSH1. Интеграция конструкции в заданной позиции подтверждалась ПЦР с помощью прймеров GSH1U и GSH1d.

Штамм *P<sub>ADH1</sub>-GSH2* был получен заменой промоторной области гена *GSH2* на регуляторную область гена *ADH1* в штамме SOA4. Для амплификации модуля *P<sub>AHD1</sub>-URA3-P<sub>ADH1</sub>* использовали праймеры GSH2- *P<sub>ADH1</sub>* и *P<sub>ADH1</sub>-GSH2* и плазмиду pKS-URA3-PADH1-LR в качестве
матрицы. Область «upstream» от промоторной области гена *GSH2* получали с помощью праймеров GSH2up2 и GSH2d\_tail и хромосомной ДНК в качестве матрицы. Кассета для замены промотора гена *GSH2* была получена ПЦР-амплификацией с использованием праймеров GSH2up2 и P<sub>ADH1</sub>-GSH2. В качестве матриц для синтеза конечной конструкции были взяты ПЦР-продукты: модуль *P<sub>AHD1</sub>-URA3-P<sub>ADH1</sub>* и область «upstream» гена *GSH2*. Интеграция конструкции в заданной позиции подтверждалась ПЦР с помощью прймеров GSH2U и GSH2U.

Штамм  $P_{ADHI}$ -GSH1  $P_{ADHI}$ -GSH2 был получен путем замены промоторной области гена GSH2 в штамме  $P_{ADHI}$ -GSH1 аналогичным, описанным выше для GSH2, способом.

Штамм  $gsh2\Delta$  был получен путем удаления рамки считывания GSH2 в штамме S288C с использованием модуля  $P_{ADHI}$ -kanR. Кассета для инактивирования гена была амплифицирована ПЦР с помощью праймеров GSH2Km-L1 and GSH2Km-R2 и плазмиды pUC19AOX-G418-BRI в качестве матрицы. Наличие делеции подтверждали ПЦР с помощью праймеров GSH2U и GSH2d.

Штамм gsh1∆ был получен таким же образом, как и штамм gsh2∆. Для получения делеционной кассеты использовали праймеры GSH1Km-L1 и GSH1Km-R2. Для подтверждения удаления гена GSH1 применяли праймеры GSH1U и GSH1d.

Штамм ecm38 $\Delta$  gsh1 $\Delta$  был получен путем последовательного удаления генов ECM38 и GSH1 в штамме DAG29. Кассету loxP-kanMX-loxP для инактивации гена ECM38 получали ПЦР-амплификацией с использованием праймеров ECM38-UGup и ECM38-UGd и плазмиду pUG6 в качестве матрицы. Для подтверждения делеции гена ECM38 использовали праймеры ECM38up и ECM38d. Кассету loxP-KlURA3-loxP для инактивации гена GSH1 аплифицировали с помощью праймеров GSH1-UG-up и GSH1-UG-d и плазмиды pUG72 в качестве матрицы. Для подтверждения удаления гена GSH1 применяли праймеры GSH1U и GSH1d. Штамм  $gsh1\Delta ecm38\Delta dug2\Delta$  был получен инактивацией гена DUG2 в штамме  $ecm38\Delta$   $gsh1\Delta$ . Делеционную кассету loxP-bleMX-loxP амплифицировали с использованием праймеров Dug2-loxPup и Dug2-loxPd и плазмиды pUG66 в качестве матрицы. Удаление гена DUG2 подтверждали с помощью праймеров DUG2up и DUG2d.

Штамм *P<sub>ADH1</sub>-PTR2* был получен заменой промоторной области гена *PTR2* на регуляторную область гена *ADH1* в штамме SOA4. Для амплификации модуля  $P_{AHDI}$ -URA3- $P_{ADHI}$ использовали праймеры PTR2-PADH1 и PADH1-PTR2 и плазмиду pKS-URA3-PADH1-LR в качестве матрицы. Область «upstream» от промоторной области гена PTR2 получали с помощью праймеров ptr52 и ptr32 и хромосомной ДНК в качестве матрицы. PTR2 Кассета для замены промотора гена была получена ПЦР-амплификацией с использованием праймеров ptr52 и PADH1-PTR2. В качестве матриц для синтеза конечной конструкции были ВЗЯТЫ ПЦР-продукты: модуль  $P_{AHD1}$ -URA3- $P_{ADH1}$  и область «upstream» гена PTR2. Интеграция конструкции в заданной позиции подтверждалась ПЦР с помощью прймеров ptr52 и ptr2-31.

Аналогичным образом, как описано выше для инактивации гена GSH1 в штамме *ecm38* $\Delta$  gsh1 $\Delta$ , были делетированы гены DUG1, GSH1, ECM38 и DUG2 в штамме SOA4  $P_{ADHI}$ -PTR2. Праймеры, использованные для амплификации делеционной кассеты гена DUG1 – Dug1-pUG72up и Dug1-pUG72d; праймеры для подтверждения инактивации – dug1-51 и dug1-31. Праймеры, использованные для амплификации делеционной GSH1 GSH1-UG-up и GSH1-UG-d; праймеры кассеты гена — ДЛЯ подтверждения инактивации – GSH1U и GSH1d. Праймеры, использованные для амплификации делеционной кассеты гена *ECM38* – ECM38up и ECM38d; праймеры для подтверждения инактивации – GSH1U и GSH1d. Праймеры, использованные для амплификации делеционной кассеты гена DUG2 -Dug2-loxPup и Dug2-loxPd; праймеры для подтверждения инактивации – DUG2up и DUG2d.

Штамм  $dug2\Delta$   $gsh1\Delta$ был получен путем последовательной инактивации генов DUG2 и GSH1 в штамме DAG29. Кассета для делеции гена DUG2 была получена методом бесшовного удаления генов (Akkada at al, 2006) с помощью ПЦР. Маркер URA3Kl амплифицировали с помощью праймеров DUG2-URA3K1 и Ura3K1-d.r.-DUG2\_tail и плазмиды pUG72 в качестве матрицы. Далее, использовали праймеры DUG2-URA3K1, DUG2d-2 фрагмент качестве синтезированный В матрицы для получения И делеционной кассеты. Инактивацию гена DUG2 подтверждали с помощью праймеров DUG2up и DUG2d. Кассету loxP-kanMX-loxP для инактивации гена GSH1 аплифицировали с помощью праймеров GSH1-UG-up и GSH1-UG-d и плазмиды pUG6 в качестве матрицы. Для подтверждения удаления гена GSH1 применяли праймеры GSH1U и GSH1d.

Штамм *ecm38* $\Delta$  *dug2* $\Delta$  был получен путем последовательного удаления генов *ECM38* и *DUG2* в штамме DAG29. Ген *ECM38* был инактивирован делеционной кассетой *loxP-kanMX-loxP*, а ген *DUG2 – loxP-KlURA3-loxP* аналогичным образом, как описано выше.

Штамм  $P_{ADHI}$ -PTR2 есm38 $\Delta$  dug2 $\Delta$  был получен путем последовательного удаления генов ECM38 и DUG2 в штамме  $P_{ADHI}$ -PTR2. Ген ECM38 был инактивирован делеционной кассетой loxP-bleMX-loxP, а ген DUG2 – loxP-KlURA3-loxP аналогичным образом, как описано выше.

Штамм  $P_{ADHI}$ -GSH1 2х $P_{ADHI}$ -GSH2 был получен путем интеграции кассеты  $P_{ADHI}$ -URA3- $P_{ADHI}$ -GSH2 в локус гена PDC1 в штамм  $P_{ADHI}$ -GSH1  $P_{ADHI}$ -GSH2. Область "upstream" гена PDC1 получали с помощью праймеров pdc1-F и PDC1\_tail и хромосомной ДНК S288C в качестве матрицы. Конструкция для «сшивания» с фрагментом регуляторной области гена PDC1 была получена с ипользованием праймеров PDC1-PADH1 и GSH2-PDC1 и хромосомной ДНК штамма  $P_{ADHI}$ -GSH1  $P_{ADHI}$ -GSH2 в качестве матрицы. Праймеры pdc1-F и GSH2-PDC1 и ПЦР-продукты, описанные выше, были взяты в качестве матриц для синтеза интеграционной кассеты. Инсерция кассеты в локус гена *PDC1* подтверждалась ПЦР с использованием прймеров pdc1-F и pdc1-R.

Штамм *opt1*Δ0 был получен инактивацией гена *OPT1* в штамме DAG29. Кассета Agleu2-CaURA3-Agleu2 для удаления гена *OPT1* была получена ПЦР с помощью праймеров hgt1-pUG6u и hgt1-pUG6d и плазмиды pAG61 в качестве матрицы. Для подтверждения удаления гена *OPT1* применяли праймеры hgt1-51 и hgt1-31.

Штамм  $P_{ADHI}$ -OPT1 был получен аналогичным образом, как и  $P_{ADHI}$ -PTR2. Для амплификации модуля  $P_{AHDI}$ -URA3- $P_{ADHI}$  использовали праймеры HGT1-PADH1 и PADH1- HGT1; "upstream" промоторной области гена HGT1 получали с помощью праймеров hgt53 и hgt33; синтез кассеты проводили с помощью праймеров hgt53 и PADH1- HGT1 и интеграцию подтверждали с использованием праймеров hgt1-51 и hgt1-31.

## 4. Результаты и обсуждение

4.1. Разработка методического подхода для изучения синтеза γ-EVG. Создание генетического инструментария «self-cloning» для обеспечения конститутивной экспрессии генов в штаммахпродуцентах

При создании штаммов-продуцентов, особенно для пищевой промышленности, в арсенале необходимо иметь генно-инженерный инструментарий, позволяющий конструировать штаммы, не содержащие чужеродной ДНК («self-cloning» штаммы).

Изменение уровня экспрессии целевых генов – одно из важных условий конструирования для успешного высокопродуктивных промышленных штаммов. Поэтому, для того чтобы была возможность контролировать экспрессию целевых генов, в нашей лаборатории был разработан простой метод замены промоторов для конструирования «self-cloning» штаммов. Данный метод основан на известном принципе комбинирования гомологичной рекомбинации И системы селекшииконтрселекции  $URA3^+$  и 5-ФОА (5-фторооротовая кислота).

Для создания конструкции, позволяющей заменять промоторы целевых генов, была сконструирована плазмида pKS-*URA3*-P<sub>ADHI</sub>-L,R (Рисунок 13). В качестве модельного промотора был выбран промотор гена *ADH1*, являющийся сильным и обеспечивающим конститутивную транскрипцию. Данная плазмида была получена в результате тандемного клонирования двух фрагментов промотора *ADH1* разной длины (550 и 700 п.н.) по обе стороны от селективного маркерного гена *URA3*. При этом промоторные области клонировались таким образом, чтобы праймеры для синтеза конструкции с помощью ПЦР «отжигались» только на 5'-конце фрагмента промотора, расположенного справа от маркерного гена. Также, праймеры для

амплификации конструкции содержали последовательности для рекомбинации с целевым локусом.



**Рисунок 13 – Схема плазмиды pKS-URA3-PADH1-L,R.** P<sub>ADH1</sub>R и P<sub>ADH1</sub>L, фрагменты промотора *ADH1*, серым цветом обозначены перекрывающиеся области. Фрагмент *URA3 S.cerevisiae*, клонированный по HindIII-HindIII, штриховкой обозначена кодирующая область гена.

После интеграции подобной конструкции в целевой локус и последующей контрселекции на минимальной среде с добавлением 5-ФОА, маркер элиминируется благодаря гомологичной рекомбинации между двумя тандемно расположенными повторами промотора *ADH1*, в результате чего в заданном месте генома остается одна копия промотора *ADH1* и отсутствует чужеродная ДНК.

Для увеличения частоты интеграции кассеты в целевой локус, возможно присоединение к ней протяженных участков, гомологичных целевому локусу, с помощью ПЦР. Схема замены промотора, основанная на синтезе конструкции с удлиненным участком для целевой рекомбинации и трансформации с последующей контрселекцией, изображена на Рисунке 14.



# Рисунок 14 – Схема замены промотора, основанная на синтезе конструкции для замены промоторов, трансформации и контрселекции

В настоящей работе все штаммы с измененной экспрессией генов были получены с помощью описанного метода.

# 4.1.1. Образование пептидов γ-EVG и γ-EV. Исследование пептидного состава дрожжевых экстрактов в условиях ферментации с добавлением предшественников

Как было отмечено в Обзоре литературы, у-глутамильные пептиды, отличные от GSH, могут синтезироваться благодаря относительно широкой субстратной специфичности ферментов, участвующих в метаболизме GSH. Соответственно, процесс их синтеза может проходить по одному из двум переноса путей: 1) В результате у-глутамилтрансферазой (GGT) γ-глутамильной группы GSH на аминокислоту/пептид (A); 2) γ-глутамил-(GCL) цистеинлигаза или другой фермент, может образовывать у-глутамильную связь между глутаматом и аминокислотой. В результате такой реакции образуется у-глутамильный дипептид, который GS (глутатион синтетаза) может использовать в качестве субстрата (Б). Предполагаемые образования у-глутамильных соединений, механизмы аналогов GSH. представлены на Рисунке 15.



Рисунок 15 – Механизмы образования ү-глутамильных пептидов. Механизм реализуемый через ү-глутамилтрансферазную реакцию (А), механизм образования через лигазную реакцию, опосредованную GCL (Б)

Для изучения возможных путей синтеза γ-EVG в *S. cerevisiae* по предполагаемым механизмам, в первую очередь необходимо было проверить способность образования пептида в диком штамме. Для этих целей мы провели ферментацию штамма дикого типа в SD.

Анализ результатов ферментации показал (Рисунок 16), что при культивировании клеток в минимальной среде образуется около 0,03 мкг ( $\pi^{-1}$  ОП<sub>600</sub>  $^{-1}$ )  $\gamma$ -EVG и почти в 10 раз больше  $\gamma$ -EV. Из полученных данных видно, что  $\gamma$ -EVG и  $\gamma$ -EV синтезируются в штамме дикого типа при росте на минимальной среде, но уровень  $\gamma$ -EVG в данных условиях близок к нижнему пределу детектирования. По этой причине было проверено, добавление каких потенциальных предшественников в среду культивирования усиливает синтез  $\gamma$ -EVG. Для этих целей была проведена ферментация штамма дикого типа в минимальной среде с добавлением глутамата, валина, глицина,  $\gamma$ -EV и VG как возможных предшественников для синтеза  $\gamma$ -EVG.



Рисунок 16 – Образование γ-EVG и γ-EV при культивировании штамма дикого типа SOA4 в минимальной среде с добавлением γ-EV, VG, валина, валина и глицина. Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Анализ пептидных продуктов в результате культивирования клеток в SD с добавлением валина (Рисунок 16) показал, что накопление γ-EV в среде

с валином увеличилось в 20 раз, а в случае культивирования клеток в SD с валином и глицином увеличились концентрации и γ-EV, и γ-EVG.

В результате ферментации клеток в SD с добавлением γ-EV (Рисунок 16) концентрации γ-EVG и γ-EV увеличились в 50 и 2500 раз, соответственно. Полученные данные согласуются с механизмом образования γ-глутамильных соединений, приведенным на Рисунке 15 Б.

Анализ экстрактов, полученных в результате культивирования в SD с добавлением VG, показал, что концентрация γ-EVG увеличилась почти в 10 раз по сравнению с накоплением пептида при культивировании в SD. Полученные результаты согласуются с механизмом, представленным на Рисунке 15 А.

Внесение L-глутамата в среды не влияло на изменение концентраций исследуемых пептидов. Видимо, как и в случае синтеза GSH из предшественников (Wang et al, 2012), пул внутриклеточного глутамата находился в избытке, поэтому при добавлении его в среду культивирования концентрация GSH не увеличивалась. По этой причине результаты ферментаций с добавлением глутамата не приведены в настоящей работе.

Таким образом, мы продемонстрировали, что синтез γ-EVG увеличивается при добавлении в среду культивирования предшественников, соответствующих обоим известным путям синтеза γ-глутамильных пептидов. В дальнейшей работе мы исследовали, какие ферменты принимают участие в синтезе γ-EVG, а также в синтезе дипептида γ-EV, который также был обнаружен в клетках *S. cerevisiae*.

# 4.2. Идентификация ферментов, участвующих в синтезе γ-EVG из различных предшественников

#### 4.2.1. Изучение пути образования γ-EVG из γ-EV

Главным претендентом на синтез γ-EVG из γ-EV являлся второй фермент синтеза GSH, GS, кодируемый геном *GSH2*. Для проверки данного

предположения, мы изучили влияние усиления экспрессии и инактивации гена *GSH2* на уровень накопления γ-EVG в условиях ферментации в среде SD с добавлением γ-EV.

Для этой цели были сконструированы производные штамма SOA4, содержащие делецию гена *GSH2* или замену промотора *GSH2* на сильный конститутивный промотор *ADH1*. Таким образом, были получены штаммы *gsh2* $\Delta$  и P<sub>ADH1</sub>-*GSH2*, соответственно. Увеличение числа копий мРНК в штамме P<sub>ADH1</sub>-*GSH2* было подтверждено ПЦР в реальном времени. Также, было продемонстрировано, что замена промотора *GSH2* на промотор *ADH1* увеличивала активность Gsh2 (Таблица 12).

Таблица 12 – Изменение экспрессии *GSH2* и активности Gsh2

Штамм	Относительная концентрация мРНК <i>GSH2</i>	Относительная активность Gsh2
WT	1	1
$P_{ADH1}$ -GSH2	$7 \pm 1$	14

После ферментации полученных штаммов в минимальной среде с добавлением  $\gamma$ -EV, экстракты анализировались на накопление  $\gamma$ -EVG. Как можно видеть на Рисунке 17, в штамме с инактивированным геном *GSH2* образование  $\gamma$ -EVG существенно ниже, чем у контрольного штамма SOA4. Штамм, в котором ген *GSH2* был сверхэкспрессирован, напротив, показал увеличение уровня накопления  $\gamma$ -EVG в 25 раз выше по сравнению с контрольным штаммом.



Рисунок 17 – Влияние инактивации и сверхэкспрессии гена *GSH2* на синтез γ-EVG из γ-EV (K – WT). Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Таким образом, полученные данные указывают на то, что Gsh2 является ферментом, синтезирующим γ-EVG из γ-EV. На Рисунке 18 представлена схема образования γ-EVG из γ-EV с помощью фермента Gsh2.



Рисунок 18 – Схема образования ү-EVG из ү-EV ферментом Gsh2

# 4.2.2. Идентификация ферментов, участвующих в синтезе γ-EVG из VG. Факторы, влияющие на образование γ-EVG из VG

## 4.2.2.1. Влияние импорта VG на синтез γ-EVG

Согласно литературным данным, ионы аммония ингибируют транспорт пептидов внутрь клеток (Hauser et al, 2001). Более того, известно, что импорт

84

дипептидов подвергается N-правилу, согласно которому, пептиды, входящие в класс N-концевых, через каскад событий способствуют деградации белка Cup9, который является репрессором главного транспортера дипептидов *PTR2*. N-концевыми пептидами называют пептиды, содержащие в N-концевой области дестабилизирующие аминокислоты (Turner et al, 2000). L-валин не относится к дестабилизирующим аминокислотам, поэтому транспортер дипептидов *PTR2* находится в клетках, культивируемых на среде с добавлением VG, в репрессированном состоянии.

Для того чтобы убрать влияние перечисленных выше факторов и усилить импорт VG в клетку, мы заменили нативную регуляторную область *PTR2* на конститутивный и сильный промотор гена *ADH1*. По результатам ферментации в среде SD+VG полученного штамма  $P_{ADH1}$ -*PTR2* (Рисунок 19) можно видеть, что при конститутивной экспрессии *PTR2*, концентрация  $\gamma$ -EVG увеличилась почти в 3,5 раза по сравнению с экспрессией *PTR2* под нативным промотором.



**Рисунок 19** – Влияние конститутивной экспрессии *PTR2* на накопление γ-EVG (К – WT). Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Таким образом, в условиях данного эксперимента нам удалось показать, что усиление импорта VG увеличивает накопление γ-EVG.

# 4.2.2.2. Влияние деградации VG на образование γ-EVG

Для последующего изучения синтеза  $\gamma$ -EVG из VG в качестве предшественника, необходимо было доказать является ли VG акцептором  $\gamma$ -глутамильной группы или источником валина и глицина, так как в описанном выше эксперименте, несмотря на увеличение накопления  $\gamma$ -EVG штаммом  $P_{ADHI}$ -PTR2, уровень накопления VG не увеличивался (Рисунок 19), что косвенно указывает на деградацию дипептида в клетках. Для решения этого вопроса, необходимо было идентифицировать пептидазы, способные деградировать VG, и определить влияние их инактивации на синтез  $\gamma$ -EVG.

В качестве пептидаз, способных деградировать VG, рассматривались аннотированные белки, обладающие пептидазной или протеазной активностью. В результате поиска были отобраны тринадцать ферментов потенциально способных деградировать VG. Так же мы включили в список выбранных пептидаз белки, участвующие в альтернативном пути деградации GSH, – Dug1, Dug2 и Dug3. Для анализа накопления VG была использована коллекция штаммов дрожжей S. cerevisiae BY4741, содержащих одиночные делеции всех генов. Ферментацию штаммов с инактивированными генами выбранных пептидаз проводили в минимальной среде с добавлением пролина (SDP) в качестве источника азота (выше было отмечено о влиянии источника азота на импорт пептидов) и 100 мг/л VG.

Анализ данных, полученных после проведения ферментации штаммов из коллекции одиночных делеций генов, выявил, что в штамме с инактивированным геном *DUG1* накопление VG в 3000 раз выше, чем в исходном штамме. Более того, концентрация  $\gamma$ -EVG в этом штамме увеличилась в 500 раз по сравнению с исходным штаммом. Кроме того, мы обратили внимание на то, что штаммы с делециями генов *DUG2* и *DUG3* не образуют  $\gamma$ -EVG (Таблица 13). Дальнейшее исследование роли белков Dug2 и Dug3 в синтезе  $\gamma$ -EVG будет описано в Главе 4.2.2.2.

	Инактивиро-	VG,	γ-EVG, мкг л <sup>-1</sup>
штамм	ванный ген	мкг л <sup>-1</sup> ОП <sub>600</sub> <sup>-1</sup>	$O\Pi_{600}^{-1}$
BY4741	-	0,2	0,7
BY4741	aap1	0,02	1,5
BY4741	dap2	0,02	1,9
BY4741	ecm14	0,07	1,3
BY4741	omal	0,02	1,8
BY4741	dug1	597,4	354,7
BY4741	sdd3	0,02	1,9
BY4741	yta12	0,13	1,1
BY4741	lap4	0,05	1,8
BY4741	prc1	0,05	2,1
BY4741	dug3	0,02	<0,05
BY4741	pep4	0,03	2,7
BY4741	pim1	0,02	1,9
BY4741	prb1	0,02	2,0
BY4741	cym1	0,05	2,4
BY4741	ape3	0,05	2,5
BY4741	dug2	0,05	<0,05

Таблица 13 – Влияние инактивации пептидаз на накопление VG и γ-EVG

Для подтверждения влияния делеции *DUG1* на накопление VG и  $\gamma$ -EVG, мы инактивировали этот ген в штамме  $P_{ADHI}$ -*PTR2*. Ферментацию штаммов  $P_{ADHI}$ -*PTR2* и  $P_{ADHI}$ -*PTR2 dug1* проводили в SD с добавлением VG. Как показано на Рисунке 20, накопление VG штаммом  $P_{ADHI}$ -*PTR2 dug1* увеличилось в 1000 раз, а накопление  $\gamma$ -EVG более, чем в 10 раз по сравнению с исходным штаммом  $P_{ADHI}$ -*PTR2*.



Рисунок 20 – Влияние делеции гена *DUG1* на накопление VG и γ-EVG штаммом *P<sub>ADH1</sub>-PTR2* в SD с добавлением VG. Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Таким образом, полученные данные указывают на то что, во-первых, Dug1 обладает пептидазной активностью *in vivo* в отношении VG. Paнee, было продемонстрировано, что Dug1 проявляет высокую субстратную специфичность в отношении дипептида цистеинил-глицина (Kaur et al, 2009). Во-вторых, VG при добавлении его в питательную среду, а не валин и глицин, является предшественником γ-EVG.

#### 4.2.2.3. Влияние GSH на синтез γ-EVG из VG

Для того чтобы подтвердить, что донором  $\gamma$ -глутамильной группы при синтезе  $\gamma$ -EVG из VG является GSH, мы изучили влияние концентрации GSH на образование  $\gamma$ -EVG. Для этих целей первый ген синтеза GSH *GSH1* был инактивирован в штамме  $P_{ADH1}$ -*PTR2*. Для полученного штамма  $P_{ADH1}$ -*PTR2* gsh1 $\Delta$  была подобрана концентрация GSH (2мкМ), ограничивающая рост культуры до ОП<sub>600</sub> 4 о.е. (*S. cerevisiae* является ауксотрофом по GSH в результате инактивации *GSH1*). В качестве нелимитирующей концентрации

GSH использовали концентрацию 200 мкМ, которая обеспечивала рост штамма  $P_{ADHI}$ -*PTR2 gsh1* $\Delta$  до ОП<sub>600</sub> родительского штамма. После подбора условий, клетки штамма  $P_{ADHI}$ -*PTR2 gsh1* $\Delta$  культивировались в SD+VG с концентрациями GSH 2 мкМ и 200 мкМ.

Как можно видеть из Рисунка 21, штамм  $P_{ADHI}$ -*PTR2 gsh1* $\Delta$  при росте в среде с добавлением 2 мкМ GSH накапливал всего 10%  $\gamma$ -EVG по сравнению с исходным штаммом, а при росте в среде с добавлением 200 мкМ GSH уровень накопления  $\gamma$ -EVG был такой же или выше, чем в исходном штамме. Из проведенного опыта можно сделать вывод, что синтез  $\gamma$ -EVG из VG зависит от концентрации GSH в ферментационной среде.



Рисунок 21 – Влияние концентрации GSH на образование  $\gamma$ -EVG из VG. За 100% взято образование  $\gamma$ -EVG при культивировании  $P_{ADHI}$ -PTR2 в минимальной среде без добавления GSH. Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Для доказательства того, что при росте на лимитирующей и нелимитирующей концентрациях GSH существует разница во внутриклеточном его накоплении, мы измерили концентрацию GSH в условиях ферментации штамма  $P_{ADHI}$ -*PTR2 gsh1* $\Delta$  в SD с добавлением 2 мкМ (0,6 мг/л) и 200 мкМ (60 мг/л) GSH (Таблица 14).

GSH в минимальной	GSH внутриклеточный,
среде, мг/л	мг л $^{-1}$ О $\Pi_{600}^{-1}$
0,6	НД*
60	$0,\!58\pm0,\!04$

**Таблица 14** – Накопление GSH штаммом  $P_{ADHI}$ -PTR2 gsh1 $\Delta$ 

\* - не детектируется, ниже предела количественного обнаружения (<1 мг/л)

Из представленных данных видно, что при росте штамма  $P_{ADHI}$ -*PTR2 gsh1* $\Delta$  в минимальной среде с лимитирующей концентрацией GSH, его накопление ниже предела количественного обнаружения (<0,1 мг/л/ ОП<sub>600</sub><sup>-1</sup>).

Таким образом, полученные результаты согласуются с нашим предположением, что GSH является донором γ-глутамильной группы при синтезе γ-EVG из VG.

#### 4.2.3. Исследование путей синтеза γ-EVG из VG

Для исследования путей синтеза  $\gamma$ -EVG из VG нами было выбрано два направления. Сначала мы решили проверить возможный вклад фермента GGT, имеющего довольно широкую субстратную специфичность, в образование  $\gamma$ -EVG из VG. Для этой цели мы инактивировали ген *ECM38*, кодирующий GGT, в штамме  $P_{ADHI}$ -*PTR2*. Полученный штамм  $P_{ADHI}$ -*PTR2 ест38* анализировали на накопление  $\gamma$ -EVG после ферментации в среде SD+VG. Как видно из Рисунка 22, штамм  $P_{ADHI}$ -*PTR2 ест38* не показал значительного изменения уровня  $\gamma$ -EVG по сравнению с исходным штаммом  $P_{ADHI}$ -*PTR2*.



Рисунок 22 – Образование γ-EVG из VG в условиях конститутивной экспрессии *PTR2* и инактивации генов *ECM38* и *DUG2* (K – P<sub>ADH1</sub>-*PTR2*). Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Сначала мы решили проверить возможный вклад фермента GGT, имеющего широкую субстратную специфичность, в образование  $\gamma$ -EVG из VG. Для этой цели мы инактивировали ген *ECM38*, кодирующий GGT, в штамме  $P_{ADHI}$ -*PTR2*. Полученный штамм  $P_{ADHI}$ -*PTR2 есm38* $\Delta$  анализировали на накопление  $\gamma$ -EVG после ферментации в среде SD+VG. Как видно из Рисунка 22, штамм  $P_{ADHI}$ -*PTR2 есm38* $\Delta$  не показал значительного изменения уровня  $\gamma$ -EVG по сравнению с исходным штаммом  $P_{ADHI}$ -*PTR2*. Из полученных данных можно сделать вывод, что инактивация *ECM38* не оказывала существенного влияния на уровень накопления  $\gamma$ -EVG в том случае, когда VG служил акцептором  $\gamma$ -глутамильной группы.

Из полученных данных можно сделать вывод, что инактивация *ECM38* не оказывала существенного влияния на уровень накопления γ-EVG в том случае, когда VG служил акцептором γ-глутамильной группы.

При поиске пептидаз с активностью по отношению к VG мы заметили, что штаммы BY4741  $dug3\Delta$  и BY4741  $dug2\Delta$  при культивировании клеток в среде с добавлением VG не образуют  $\gamma$ -EVG (см. Таблицу 13). Поэтому в качестве второго направления в исследовании пути синтеза  $\gamma$ -EVG из VG, мы решили проверить возможность образования  $\gamma$ -EVG из VG комплексом белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>. Для данного эксперимента мы инактивировали ген

91

DUG2 в штамме  $P_{ADHI}$ -PTR2 и полученный штамм  $P_{ADHI}$ -PTR2  $dug2\Delta$ культивировали в среде SD с добавлением VG. Анализ проведенной ферментации показал, что накопление  $\gamma$ -EVG в штамме  $P_{ADHI}$ -PTR2  $dug2\Delta$  не происходило (Рисунок 22), из чего следует, что образование  $\gamma$ -EVG из VG осуществляется в основном благодаря комплексу белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>. Таким образом, полученные данные указывают на то, что комплекс белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> обладает  $\gamma$ -глутамилтрансферазной активностью.

На Рисунке 23 представлена схема образования γ-EVG из VG комплексом белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>.



Рисунок 23 – Схема образования γ-EVG из VG комплексом белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> и Ecm38

#### 4.2.4. Идентификация ферментов, участвующих в синтезе γ-EV

#### 4.2.4.1. Синтез γ-EV ферментами деградации GSH

Как было отмечено выше, образование ү-глутамильных пептидов может происходить в результате метаболизма GSH двумя способами: благодаря ү-глутамилтрансферазной активности ферментов деградативного пути GSH и посредством ферментов синтеза GSH.

Для того чтобы исследовать образование  $\gamma$ -EV ферментами деградативного пути, мы сконструировали штамм с инактивированным геном *GSH1*. Далее была проведена ферментация штамма *gsh1* $\Delta$  в условиях культивирования в среде SD с добавлением 1 г/л валина и лимитирующей и

нелимитирующей рост клеток концентрациями GSH, 2 мкМ и 200 мкМ, соответственно. Как видно из Рисунка 24, штамм с инактивированным геном *GSH1* в условиях роста с добавлением валина и нелимитирующей концентрации GSH имел тот же уровень накопления  $\gamma$ -EV, что и исходный штамм (SOA4 при росте в SD с добавлением 1 г/л валина). В условиях культивирования штамма *gsh1* $\Delta$  в среде SD с валином и лимитирующей рост концентрацией GSH уровень накопления  $\gamma$ -EV составил 20% от накопления родительским штаммом. Этот результат подтверждает предположение о том, что в описанных условиях образование  $\gamma$ -EV происходит ферментами деградативного пути, и донором  $\gamma$ -глутамильной группы является GSH.



Рисунок 24 – Влияние делеций *DUG2* и *ECM38* на синтез  $\gamma$ -EV в условиях блокировки синтеза GSH *in vivo* (К – *gsh1* $\Delta$ ). За 100% взято образование  $\gamma$ -EV при культивировании WT в среде SD с добавлением 1 г/л валина. Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Для того чтобы исследовать вклад ферментов деградативного пути, комплекса белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> и Ecm38, в синтез  $\gamma$ -EV из валина, мы ввели в штамм gsh1 $\Delta$  следующие модификации: делеции генов ECM38 и DUG2 по отдельности, а также совместили делеции этих генов в одном штамме. Таким образом, были сконструированы штаммы gsh1 $\Delta$  ecm38 $\Delta$ , gsh1 $\Delta$  dug2 $\Delta$  и  $gsh1\Delta$   $ecm38\Delta$   $dug2\Delta$ . Ферментацию полученных штаммов проводили в условиях, описанных выше для штамма  $gsh1\Delta$ .

По результатам ферментации штаммов в среде SD с добавлением валина и лимитирующей и нелимитирующей концентрациями GSH (Рисунок 24) можно видеть, что накопление  $\gamma$ -EV значительно снижалось только в штамме gsh1 $\Delta$  ecm38 $\Delta$  dug2 $\Delta$ . В штаммах с инактивированными генами ECM38 и DUG2 по отдельности уровень накопления  $\gamma$ -EV был как минимум не ниже, чем в исходном штамме.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что синтез  $\gamma$ -EV осуществляется и Ecm38, и комплексом (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>. Кроме того, поскольку одиночные делеции *ECM38* и *DUG2* не влияли на уровень  $\gamma$ -EV, можно предположить, что при достижении определенной внутриклеточной концентрации дипептида, начинается его деградация.

Для дополнительного доказательства того, что комплекс (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> и Ecm38 используют именно GSH в качестве донора  $\gamma$ -глутамильного остатка при синтезе  $\gamma$ -EV, мы измерили концентрацию GSH в штаммах *gsh1* $\Delta$ , *gsh1* $\Delta$  *ecm38* $\Delta$ , *gsh1* $\Delta$  *dug2* $\Delta$  и *gsh1* $\Delta$  *ecm38* $\Delta$  *dug2* $\Delta$ . Исследуемые штаммы культивировались в среде SD с нелимитирующей концентрацией GSH (200 мкМ). Результаты ферментации приведены на Рисунке 25.



Рисунок 25 – Изменение концентрации GSH в условиях блокировки синтеза GSH *in vivo* при инактивации генов *ECM38* и *DUG2* (К – *gsh1*Δ). Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Можно видеть, что в штаммах, которые содержат одиночные делеции генов *ECM38* и *DUG2* концентрация GSH увеличилась в два раза по сравнению с исходным штаммом. В то же время в штамме, в котором инактивированы оба гена *ECM38* и *DUG2*, концентрация GSH стала больше почти в 4 раза по сравнению с родительским штаммом, что указывает на наличие суммарного эффекта двух делеций.

Полученный результат подтверждает предположение о том, что GSH является донором ү-глутамильного остатка для синтеза ү-EV комплексом (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> и Ecm38 в условиях, когда *GSH1* инактивирован.

#### 4.2.4.2. Образование у-EV ферментами синтеза GSH

Для того чтобы исследовать возможность образования  $\gamma$ -EV под действием первого фермента синтеза GSH, Gsh1, был проведен следующий опыт. Мы инактивировали гены *ECM38* и *DUG2* в штамме дикого типа DAG29. Полученный штамм *ecm38 dug2* культивировали в среде SD с добавлением 1г/л валина. По результатам ферментации (Рисунок 26) видно, что штамм *ecm38 dug2* накапливал столько же  $\gamma$ -EV, сколько исходный штамм. Этот факт указывает на то, что при данном генотипе  $\gamma$ -EV образуется в результате соединения глутамата и валина, катализирумого ферментом Gsh1, так как выше было показано, что при инактивации генов *ECM38*, *DUG2* и *GSH1* накопление  $\gamma$ -EV отсутствует. Для дополнительного подтверждения того, что образование  $\gamma$ -EV осуществляется Gsh1 в случае, когда гены *ECM38* и *DUG2* инактивированы, мы заменили нативную регуляторную область гена *GSH1* на конститутивный промотор гена *ADH1*. Увеличение экспрессии *GSH1* было подтверждено ПЦР в реальном времени и измерением активности Gsh1 (Таблица 15).

Штамм	Относительная	Относительная
	концентрация мРНК GSH1	активность Gsh1
WT	1	1
P <sub>ADH1</sub> -GSH1	$11 \pm 1$	3.3

Таблица 15 – Изменение экспрессии GSH1 и активности Gsh1

Ферментацию штамма  $P_{ADHI}$ -GSH1 ест38 $\Delta$  dug2 $\Delta$  проводили в условиях, описанных выше для штамма ест38 $\Delta$  dug2 $\Delta$ . Как видно из Рисунка 26, накопление  $\gamma$ -EV в штамме  $P_{ADHI}$ -GSH1 ест38 $\Delta$  dug2 $\Delta$  в 8 раз выше по сравнению с родительским штаммом ест38 $\Delta$  dug2 $\Delta$ .



Рисунок 26 – Влияние инактивации генов *ECM38*, *DUG2* и сверхэкспрессии *GSH1* на образование γ-EV (К – WT). Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Таким образом, можно заключить, что синтез γ-EV способен проходить двумя путями. Во-первых, Gsh1 может соединять глутамат с валином с образованием γ-EV. Во-вторых, γ-EV может образовываться в результате активности ферментов деградации GSH, комплекса белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> и/или Ecm38, которые способны перенести γ-глутамильный остаток GSH на валин.

На Рисунке 27 представлена схема образования γ-EV ферментами метаболизма GSH при использовании валина в качестве предшественника.



Рисунок 27 – Схема образования γ-EV из валина ферментами метаболизма GSH

#### 4.3. Синтез γ-EVG при усилении экспрессии генов биосинтеза GSH

Ранее мы показали возможность образования γ-EV ферментом Gsh1 при культивировании штаммов в среде с валином. Также была продемонстрирована способность синтеза γ-EVG белком Gsh2 в процессе культивирования штаммов в среде с добавлением γ-EV.

Для того чтобы исследовать эффективность образования  $\gamma$ -EVG ферментами биосинтеза GSH, мы проанализировали накопление  $\gamma$ -EVG при одновременной сверхэкспрессии генов *GSH1* и *GSH2*. Для этой цели мы заменили промотор гена *GSH2* на конститутивный промотор гена *ADH1* в штамме  $P_{ADH1}$ -*GSH1*. Полученный штамм  $P_{ADH1}$ -*GSH1*  $P_{ADH1}$ -*GSH2* культивировали в SD с добавлением валина и глицина, так как ранее было продемонстрировано, что присутствие глицина в среде увеличивает накопление  $\gamma$ -EVG (Рисунок 16).

По результатам ферментации (Рисунок 28) можно заключить, что замена промотора *GSH2* на регуляторную область гена *ADH1* в штамме  $P_{ADH1}$ -*GSH1* значительно изменила соотношения  $\gamma$ -EV и  $\gamma$ -EVG. Концентрация  $\gamma$ -EVG в штамме  $P_{ADH1}$ -*GSH1*  $P_{ADH1}$ -*GSH2* увеличилась почти в 4 раза по сравнению с исходным штаммом. В то же время конверсия  $\gamma$ -EV в  $\gamma$ -EVG составила только 40%.



Рисунок 28 – Синтез γ-EVG при усиленной экспрессии генов синтеза GSH. Штаммы культивировались в среде SD с добавлением валина и глицина. Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Для того чтобы подтвердить, что конверсия  $\gamma$ -EV в  $\gamma$ -EVG лимитирована глутатионсинтазной активностью, мы интегрировали вторую копию *GSH2* под контролем промотора гена *ADH1* в локус *PDC1* штамма  $P_{ADH1}$ -*GSH1*  $P_{ADH1}$ -*GSH2*. Для накопления  $\gamma$ -EVG полученный штамм  $P_{ADH1}$ -*GSH1*  $2xP_{ADH1}$ -*GSH2* культивировали в условиях, описанных выше для  $P_{ADH1}$ -*GSH1* и  $P_{ADH1}$ -*GSH1*  $P_{ADH1}$ -*GSH2* (Рисунок 28) можно видеть, что концентрация  $\gamma$ -EVG увеличилась в 2 раза по сравнению  $P_{ADH1}$ -*GSH1*  $P_{ADH1}$ -*GSH2*, что составило примерно 80% суммарной конверсии  $\gamma$ -EV в  $\gamma$ -EVG. Таким образом, для более полной конверсии  $\gamma$ -EV, образующегося в результате сверхэксперссии *GSH1*, в  $\gamma$ -EVG необходим более высокий уровень экспрессии *GSH2*.

По-видимому, неполная конверсия даже при амплификации гена *GSH2* под конститутивным промотором, связана с тем, что белок Gsh2 имеет невысокую субстратную специфичность к γ-EV, что не противоречит литературным данным, согласно которым очищенная GS из почечной ткани крыс при измерении *in vitro* показала нулевую или слабую активность по отношению к большинству γ-глутамильных пептидов, кроме γ-глутамил-L-цистеина (102%), γ-глутамил-L-серина (77%) и γ-глутамил-L-аланина (55%). За 100% была взята активность GS по отношению к γ-глутамил-L-α-аминобутирату (Oppenheimer et al, 1979).

Таким образом, можно сделать два вывода. Во-первых, штамм  $P_{ADHI}$ -GSH1 2x $P_{ADHI}$ -GSH2 способен более, чем в 40 раз эффективнее образовывать  $\gamma$ -EVG (накопление  $\gamma$ -EVG – 4 мкг л<sup>-1</sup> ОП<sub>600</sub><sup>-1</sup>, Рисунок 28), чем штамм дикого типа в тех же условиях (накопление  $\gamma$ -EVG – 0,2 мкг л<sup>-1</sup> ОП<sub>600</sub><sup>-1</sup>, Рисунок 16). Во-вторых, невысокую субстратную специфичность Gsh2 по отношению к  $\gamma$ -EV можно компенсировать путем его дальнейшей амплификации.

#### 4.4. Поиск импортера γ-EVG

Для того чтобы исследовать способность  $\gamma$ -EVG транспортироваться внутрь клетки, мы провели ферментацию штамма SOA4 в среде SD с добавлением 100 мг/л  $\gamma$ -EVG. Как видно из Рисунка 29, штамм SOA4 накапливал 13 мг л<sup>-1</sup> ОП<sub>600</sub><sup>-1</sup>  $\gamma$ -EVG. В качестве главного претендента, способного к переносу  $\gamma$ -EVG внутрь клетки, исследовался известный транспортер олигопептидов и GSH Opt1 (также называемый Hgt1, или Gsh11).



Рисунок 29 – Образование γ-EVG в условиях инактивации и конститутивной экспрессии гена *HGT1*(K – WT). Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Для проверки предположения, что Hgt1 является транспортером  $\gamma$ -EVG внутрь клетки, мы изучили влияние сверхэкспрессии и инактивации гена *HGT1* в условиях ферментации клеток с добавлением  $\gamma$ -EVG. Для этих целей в штамме дикого типа был удален ген *HGT1* и полученный штамм *hgt1* $\Delta$  культивировался в среде SD с добавлением 100 мг/л  $\gamma$ -EVG. По результатам ферментации (Рисунок 29) видно, что накопление  $\gamma$ -EVG в штамме *hgt1* $\Delta$  снизилось более чем в 100 раз, что указывает на то, что Hgt1 является основным транспортером  $\gamma$ -EVG в клетку.

Для дальнейшего подтверждения влияния *HGT1* на уровень накопления  $\gamma$ -EVG мы обеспечили этот ген конститутивной экспрессией. Для этих целей в штамме SOA4 заменили промоторную область гена *HGT1* на промотор гена *ADH1*, который является сильным и конститутивным. Полученный штамм  $P_{ADH1}$ -*HGT1* культивировали способом, описанным выше для штамма *hgt1* $\Delta$ . Как видно из Рисунка 29, замена промотора *HGT1* на промотор *ADH1* увеличила накопление  $\gamma$ -EVG.

Таким образом, из представленных данных видно, что за транспорт γ-EVG внутрь клетки отвечает *HGT1*, кодирующий импортер GSH и олигопептидов.

#### Выводы

- 1. Создан генетический инструментарий для многократной «бесшовной» замены промоторов целевых генов *S. cerevisiae*.
- 2. Продемонстрировано, что синтез γ-EV и γ-EVG осуществляется в клетках *S. cerevisiae* и за него отвечают гены синтеза и деградации глутатиона.
- Впервые получены данные, указывающие на то, что отщепляющий γ-глутамильную группу глутатиона комплекс (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>, участвует в переносе γ-глутамильной группы на VG и валин.
- 4. Впервые продемонстрировано, что ген *DUG1*, кодирующий пептидазу, специфичную к CG, отвечает за деградацию дипептида VG.
- 5. Впервые продемонстрировано, что ген *OPT1*, кодирующий импортер олигопептидов и глутатиона, отвечает за транспорт γ-EVG внутрь клетки.
- Показано, что сверхэкспрессия генов синтеза глутатиона, *GSH1* и *GSH2*, приводит к увеличению синтеза γ-EVG у S. cerevisiae.

## Список сокращений

- ү-EV ү-глутамил-валин
- ү-EVG ү-глутамил-валил-глицин
- VG валил-глицин
- GSH восстановленный GSH
- GSSG окисленный GSH
- hGSH гомоGSH, или γ-глутамил-L-цистеинил-β-аланин
- ЭР эндоплазматический ретикулум
- YPD среда, содержащая дрожжевой экстракт, пептон и глюкозу
- SD синтетическая среда с глюкозой
- SDP синтетическая среда с глюкозой и пролином

ВЭЖХ/МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография, сопряженная с тандемной масс-спектрометрией

LC-Q-TOF-MS/MS – квадраупольная, времяпролетная масс-спектрометрия,

сопряженная с ВЭЖХ

- ПЦР полимеразная цепная реакция
- т.п.н. тысяч пар нуклеотидов
- п. н. пар нуклеотидов
- ак. о. аминокислотные остатки
- CaCR кальций-чувствительный рецептор
- ARE элемент, отвечающий на воздействие антиоксидантов
- EpRE элемент, отвечающий на воздействие электрофилов
- MRE элемент, отвечающий на воздействие металлов
- GS глутатион синтаза
- GSL ү-глутамил-цистеин лигаза
- GGT ү-глутамилтрансфераза
- GGCT ү-глутамилциклотрансфераза
- LAP лейцил-аминопептидаза
- MDP мембранная дипептидаза

#### 102

- BLAST средство поиска основного локального выравнивания
- АТФ аденозин-5'-трифосфат
- АДФ аденозин-5'-дифосфат
- ФЕП фосфоенолпируват
- ЭДТА этилендиаминтетраацетат
- NADH никотинамидадениндинуклеотид
- 5-ФОК 5-фторооротовая кислота
- $O\Pi-$ оптическая плотность
- о.е. оптические единицы

## Список цитируемой литературы

- Akada R. (2002). Genetically modified industrial yeast ready for application. J Biosci Bioeng. 94: 536 – 544.
- Akada R., Kitagawa T., Kaneko S., Toyonaga D., Ito S., Kakihara Y., et al. (2006). PCR-mediated seamless gene deletion and marker recycling in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 23: 399–405.
- Alani E., Cao L. and Kleckner N. (1987). A Method for Gene Disruption That Allows Repeated Use of USR3 Selection in the Construction of Multiply Disrupted Yeast Strains. Genetics. 116(4): 541–545.
- Arkkila P.E., Koskinen P.J., Kantola I.M., Rönnemaa T., Seppänen E., Viikari J.S. (2001). Diabetic complications are associated with liver enzyme activities in people with type 1 diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 52(2): 113-118.
- Arrigo A.P. (1999). Gene expression and the thiol redox state. Free Radic Biol Med. 27(9-10): 936-944.
- Bachhawat A.K. and Kaur A. (2017). Glutathione degradation. Antioxid. Redox Signal. 27: 1200–1216.
- Baudouin-Cornu P., Lagniel G., Kumar C., Huang M.E., Labarre J. (2012). Glutathione degradation is a key determinant of glutathione homeostasis. J Biol Chem. 287(7): 4552-4561.
- Becker D.M., Lundblad V. Introduction of DNA into yeast cells. (1997). Current Protocols in Molecular Biology. 13.7.1-13.7.10.
- Becatorou A., Psarianos C. and Koutinas A.A. (2006). Production of Food Grade Yeasts. Food Technol. Biotechnol. 44 (3): 407–415.
- Bittner S., Win T., Gupta R. (2005). γ-L-glutamyltaurine. Amino Acids. 28: 343–356.
- Board P.G., Moore K.A. and Smith J.E. (1978). Purification and Properties of y-Glutamylcyclotransferase from Human Erythrocytes. Biochem. J. 173:427-231.

- Boeke J.D., LaCroute F., Fink G.R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. Mol Gen Genet. 197: 345 – 346.
- Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR (1987) 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. Methods Enzymol. 154: 164 175.
- Brown K. E., Kinter M. T., Oberley T. D., Freeman M. L., Frierson H. F., Ridnour L. A., Tao Y., Oberley L. W. and Spitz D. R. (1998). Enhanced gamma-glutamyl transpeptidase expression and selective loss of CuZn superoxide dismutase in hepatic iron overload. Free Radic. Biol. Med. 24: 545–555.
- Cagen L.M., Zusman R.M., Pisano J.J. (1979). Formation of 1a, 1b dihomoprostaglandin E2 by rabbit renal intersititial cell cultures. Prostaglandins. 18(4): 617-621.
- Campbell B. J., Lin Y.-C., Davis R. V., & Ballew E. (1966). The purification and properties of a particulate renal dipeptidase. Biochim. Biophys. Acta. 118: 371–386.
- Cappiello M., Alterio V., Amodeo P., Del Corso A., Scaloni A., Pedone C., Moschini R., De Donatis G. M., De Simone G., Mura U. (2006). Metal Ion Substitution in the Catalytic Site Greatly Affects the Binding of Sulfhydryl-Containing Compounds to Leucyl Aminopeptidase. Biochemistry. 45: 3226-3234.
- Cappiello M., Lazzarotti A., Buono F., Scaloni A., Ambrosio C.D., Pietro A., M'endez B.L., Pelosi P., Del Corso A., Mura U. (2004). New role for leucyl aminopeptidase in glutathione turnover. Biochem. J. 378: 35–44.
- Castellano I. and Merlino A. (2012). γ-Glutamyltranspeptidases: sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications. Cell. Mol. Life Sci. 69: 3381–3394.
- 20. Carmel-Harel O. and Storz G. (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-depent reduction systems in the *Esherichia coli* and

*Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. Annual Review of Microbiology. 54: 439-461.

- Chae H.J., Joo H. and In M.J., (2001). Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1. Effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. Bioresour Technol. 76: 253–258.
- 22. Chandel A., Das K.K., Bachhawat A.K. (2016). Glutathione depletion activates the yeast vacuolar transient reseptor potencial channel, Yvc1p, by reversible glutathionylation of specific cysteines. Molecular Biology of the Cell. 27: 3913-3925.
- Chen Y., Scanlan J., Song L., Crombie A., Rahman M. T., Schäfer H. and Murrell J. C. (2010). γ-Glutamylmethylamide Is an Essential Intermediate in the Metabolism of Methylamine by *Methylocella silvestris*. Appl Environ Microbiol. 76(13): 4530–4537.
- Chevalier C., Thiberge J.M., Ferrero R.L., Labigne A. (1999). Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. Mol Microbiol 31: 1359–1372.
- 25. Cliffe E.E. and Waley S.G. (1958). Acidic peptides of the lens. 4. The biosynthesis of ophthalmic acid. Biochem J. 69(4): 649–655.
- 26. Coffman J.A., Rai R., Cunningham T., Svetlov V., Cooper T.G. (1996). Gat1p, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogencatabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. 16(3): 847-858.
- Coloma J. and Pitot H.C. (1986). Characterization and sequence of a cDNA clone of gamma-glutamyltranspeptidase. Nucleic Acids Res. 14(3): 1393–1403.
- Collart M.A. and Oliviero S. Preparation of Yeast RNA. (1993). In Ausubel FM, Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., editors. Current Protocols in Molecular Biology. New York: Wiley: 13.12.1-13.12.5.

- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 339(6121): 819-823.
- Copley S. D. and Dhillon J. K. (2002). Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes. Genome Biology. 3(5): research0025.1–0025.16.
- Crawford R.R., Prescott E.T, Sylvester C.F., Higdon A. N., Shan J., Kilberg M.S., and Mungrue I.N. (2014). Human CHAC1 Protein Degrades Glutathione, and mRNA Induction Is Regulated by the Transcription Factors ATF4 and ATF3 and a Bipartite ATF/CRE Regulatory Element. The Journal of Biological Chemistry. 290 (25): 15878–15891.
- 32. Curthoys N. and Hughey R. (1978). Characterization and physiological function of rat renal gamma-glutamyltranspeptidase. Enzyme. 24: 383-403.
- 33. Dahl N., Pigg M., Ristoff E., Gali R., Carlsson B., Mannervik B., Larsson A., Board P. (1997). Missense mutations in the human glutathione synthetase gene result in severe metabolic acidosis, 5-oxoprolinuria, hemolytic anemia and neurological dysfunction. Human molecular genetics. 6: 1147-1152.
- 34. Davies J., Evans R.H., Jones A.W., Smith D.A., Watkins J.C. (1982). Differential activation and blockade of excitatory amino acid receptors in the mammalian and amphibian central nervous systems. Comp Biochem Physiol C 72: 211–224.
- 35. Desai P.R., Thakur A., Ganguli D., Paul S., Morschhäuser J., Bachhawat A.K. (2011). Glutathione utilization by *Candida albicans* requires a functional glutathione degradation (DUG) pathway and OPT7, an unusual member of the oligopeptide transporter family. The Journal of Biological Chemistry. 286(48): 41183–41194.
- 36. Deng W., Ogita S., Ashihara H. (2008). Biosynthesis of theanine (γ-ethylamino-L-glutamic acid) in seedlings of *Camellia sinensis*. Phytochemistry Letters 1: 115–119.

- Deng W., Ogita S., Ashihara H. (2009). Ethylamine Content and Theanine Biosynthesis in Different Organs of Camellia sinensis Seedlings. Z Naturforsch C. 64(5-6): 387-390.
- DiCarlo J.E., Norville J.E., Mali P., Rios X., Aach J. and Church G.M. (2013). Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Research. Vol. 41, No. 7.
- Dinescu A., Cundari T. R., Bhansali V. S., Luo J. L. and Anderson M. E. (2004). Function of conserved residues of human glutathione synthetase implications for the ATP-grasp enzymes. J. Biol. Chem.279: 22412–22421.
- Douglas K.T. (1987). Mechanisms of action of glutathione-dependent enzymes. In: Advances in Enzymology, ed. A. Meister, New York: John Wiley and Sons. 103-167.
- Dringen R., Gutterer J. M., Gros C., Hirrlinger J. (2001). Aminopeptidase N Mediates the Utilization of the GSH Precursor CysGly by Cultured Neurons. Journal of Neuroscience Research. 66:1003–1008.
- 42. Dunkel A., Köster J., Hofmann T. (2007). Molecular and sensory characterization of gamma-glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (Phaseolus vulgaris L.). J Agric Food Chem. 55(16): 6712-6719.
- Fawaz M.V., Topper M. and Firestine S.M. (2011). The ATP-Grasp Enzymes. Bioorg Chem. 39(5-6): 185–191.
- 44. Feuer L., Torok L.J., Kapa E., Csaba G. (1978). The effect of gamma-L-glutamyl-taurine (Litoralon) on the amphibian metamorphosis. Comp Biochem Physiol. 61C: 67–71.
- 45. Feuer L., Gaal K. (1979). Effect of glutaurine on plasma renin activity in the rat and the dog. Gen Comp Endocrinol 39: 330–335.
- Feuer L., S-Rozsa K. (1981). Effect of Litoralon, taurine and other taurine derivatives on the heart muscle cell membrane of the Locusta migratoria (migratororioides R. F.). Comp Biochem Physiol 69C: 411–414.
- 47. Fukuchi J., Kashiwagi K., Yamagishi M., Ishihama A., Igarashi K. (1995). Decrease in cell viability due to the accumulation of spermidine in spermidine acetyltransferase-deficient mutant of *Escherichia coli*. J Biol Chem. 270(32): 18831-18835.
- Forman H.J. and Skelton D.C. (1990). Protection of alveolar macrophages from hyperoxia by gamma-glutamyl transpeptidase. Am. J. Physiol. 259: 102–107.
- 49. Hall, A.G. (1999). The role of glutathione in the regulation of apoptosis.Eur. J. Clin. Invest. 29: 238 245.
- 50. Hanes C.S. and Hird FJ. (1950). Synthesis of peptides in enzymic reactions involving glutathione. Nature. 166: 288–292.
- Hanigan M. H. (1998). gamma-Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. Chem Biol Interact. 111-112: 333-342.
- Hanigan M. H. and Ricketts W. A. (1993). Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. Biochemistry. 32: 6302–6306.
- Hattori R., Matsushita-Morita M., Tada S., Suzuki S., Furukawa I., Yamagata Y., Amano H., Ishida H., Takeuchi M. (2011). Characterization of an *Aspergillus oryzae* Cysteinyl Dipeptidase Expressed in *Escherichia coli*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 75: 159-161.
- 54. Hauser M, Narita V, Donhardt AM, Naider F, Becker JM. (2001). Multiplicity and regulation of genes encoding peptide transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Membr Biol. 18(1): 105-12.
- 55. Heisterkamp N., Groffen J., Warburton D., Sneddon T.P. (2008). The human gamma-glutamyltransferase gene family. Human genetics. 123: 321-332.
- Hicks L.M., Cahoon R.E., Bonner E.R., Rivard R.S., Sheffield J.and Jez J.M. (2007). Thiol-based regulation of redox-active glutamate-cysteine ligase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 19: 2653–2661.

- Higashi T., Tateishi N., Naruse A., Sakamoto Y. (1977). A novel physiological role of liver glutathione as a reservoir of L-cysteine. J Biochem. 82(1): 117–124.
- Hirosawa I., Aritomi K., Hoshida H., Kashiwagi S., Nishizawa Y. and Akada R. (2004). Construction of a self-cloning sake yeast that overexpresses alcohol acetyltransferase gene by a two-step gene replacement protocol. Appl Microbiol Biotechnol. 65: 68 73.
- Holmgren A. (1976). Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. Proc Natl Acad Sci U S A. 73(7): 2275-2279.
- Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat. Biotechnol. 31(9): 827-832.
- 61. Huang C. S., Anderson M. E., Meister A. (1993). Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. J. Biol. Chem. 268: 20578–20583.
- 62. Hwang C., Sinsky A. J., and Lodish H. F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. Science 257: 1496–1502.
- Fan C., Moews P. C., Shi Y., Walsh C. T., and Knox J. R. (1995). A common fold for peptide synthetases cleaving ATP to ADP: glutathione synthetase and D-alanine:D-alanine ligase of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92. 1172–1176.
- Fraser J. A., Saunders R. D., McLellan L. I. (2002). *Drosophila melanogaster* glutamate–cysteine ligase activity is regulated by a modifier subunit with a mechanism of action similar to that of the mammalian form. J. Biol. Chem. 277: 1158–1165.
- Galiazzo F, Schiesser A, Rotilio G. (1987). Glutathione peroxidase in yeast: presence of the enzyme and induction by oxidative conditions. Biochem. Biophys. Res. Commun.147: 1200–1205.

- 66. Ganguli D., Kumar C., Bachhawat A.K. (2007). The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 175(3): 1137-1151.
- Geisinger J.M., Turan S., Hernandez S., Spector L.P., Calos M.P. (2016). *In vivo* blunt-end cloning through CRISPR/Cas9-facilitated non-homologous end-joining. Nucl. Acids Res. 44(8):e76.
- Glabasnia A. and Hofmann T. (2006). Sensory-directed identification of tasteactive ellagitannins in American (Quercus alba L.) and European oak wood (Quercus robur L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oakmatured red wines. J Agric Food Chem. 54: 3380–3390.
- 69. Goebel G., Berger R., Strasak A., Egle D., Müller-Holzner E., Schmidt S., Rainer J., Presul E., Parson W., Lang S. (2012). Elevated mRNA expression of CHAC1 splicing variants is associated with outcome for breast and ovarian cancer patients. British journal of cancer.106: 189-198.
- Gogos A. and Shapiro L. (2002). Large Conformational Changes in the Catalytic Cycle of Glutathione Synthase . Structure. 10: 1669–1676.
- Goodspeed D.C, Dunn T.J, Miller C.D and Pitot H.C. (1989). Human gammaglutamyl transpeptidase cDNA: comparison of hepatoma and kidney mRNA in the human and rat. Gene. 76(1): 1-9.
- 72. Gopal S., Borovok I., Ofer A., Yanku M., Cohen G., Goebel W., Kreft J. and Aharonowitz Y. (2005). A multidomain fusion protein in *Listeria monocytogenes* catalyzes the two primary activities for glutathione biosynthesis, J. Bacteriol. 187:3839–3847.
- 73. Grant C.M. and Dawes I.W. (1996). Synthesis and role of glutathione in protection against oxidative stress in yeast. Redox Rep. 2: 223-229.
- Griffith O.W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Radic. Biol. Med. 27(9–10): 922–935.
- Griffiths S. A., Good V. M., Gordon L. A., Hudson E. A., Barrett M. C., Munks R. J. and Manson M. M. (1995). Characterization of a promoter for

gamma-glutamyl transpeptidase activated in rat liver in response to aflatoxin B1 and ethoxyquin. Mol. Carcinog. 14: 251–262.

- 76. Gromes R., Hothorn M., Lenherr E. D., Rybin V., Scheffzek K. and Rausch T. (2008). The redox switch of γ-glutamylcysteine ligase via a reversible monomer–dimer transition is a mechanism unique to plants. The Plant Journal. 54: 1063–1075
- 77. Griffith O.W. and Mulcahy R.T. (1999). The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 73: 209-267.
- 78. Grzam A., Martin M.N., Hell R., Meyer A.J. (2007). γ-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. FEBS Lett. 581: 3131–3138.
- Guo-jie, Breslow E. and Meister A. (1996). The Amino Acid Sequence of Rat Kidney 5-Oxo-L-Prolinase Determined by cDNA Cloning. The Journal of Biological Chemistry. 271(50): 32293–32300.
- Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J, Hegemann JH. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. Nucleic Acids Research. 1996;24: 2519-2524.
- B1. Gushima H., Yasuda S., Soeda E., Yokota M., Kondo M., Kimura A. (1984).
   Complete nucleotide sequence of the E. coli glutathione synthetase gsh-II.
   Nucleic Acids Res. 12(24): 9299-9307.
- Ichinose H., Togari A., Suzuki H., Kumagai H., Nagatsu T. (1987). Increase of catecholamines in mouse brain by systemic administration of g-glutamyl L-3,4-dihydroxyphenylalanine. J Neurochem 49: 928–932.
- Inoue Y. and Kimura A. (1995). Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms. Adv Microb Physiol. 37: 177-227.
- 84. Inoue M., Hiratake J., Suzuki H., Kumagai H., and Sakata K. (2000). Identification of catalytic nucleophile of *Escherichia coli*  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase by  $\gamma$ -monofluorophosphono derivative of glutamic

acid: N-terminal Thr-391 in small subunit is the nucleophile. Biochemistry 39: 7764–7771.

- 85. Izawa S., Inoue Y., Kimura A. (1985). Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 368(1): 73-76.
- Jamieson D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Yeast. Vol. 14, Issue 16: 1511–1527.
- Janowiak B.E., Griffith O.W. (2005). Glutathione synthetase in *Streptococcus agalactiae*. J. Biol. Chem. 280: 11829–11839.
- Jaspers C.J., Gigot D., Penninckx M.J. (1985). Pathways of glutathione degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Phytochemistry 24(4): 703-707.
- Jaspers C.J. and Penninckx M.J. (1984). Glutathione metabolism in yeast Saccharomyces cerevisiae. Evidence that γ-glutamyltranspeptidase is a vacuolar enzyme. Biochimie 66: 71-74.
- 90. Joo N.E., Ritchie K., Kamarajan P., Miao D., Kapila Y.L. (2012). Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1. Cancer medicine. 1: 295-305.
- 91. Ivey D.M., Guffanti A.A., Zemsky J., Pinner E., Karpel R., Padan E., Schuldiner S., Krulwich T.A. (1993). Cloning and characterization of a putative Ca<sup>2</sup>+/H+ antiporter gene from *Escherichia coli* upon functional complementation of Na+/H+ antiporter-deficient strains by the overexpressed gene. J Biol Chem 268: 11296–11303.
- 92. Kaur H., Ganguli D., Bachhawat A.K. (2012). Glutathione degradation by the alternative pathway (DUG pathway) in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated by (Dug2p-Dug3p)<sub>2</sub> complex, a novel glutamine amidotransferase (GATase) enzyme acting on glutathione. J Biol Chem. 287(12): 8920-8931.
- Kaur A., Gautam R., Srivastava R., Chandel A., Kumar A., Karthikeyan S., Bachhawat A.K. (2016). ChaC2, an Enzyme for Slow Turnover of Cytosolic Glutathione. J. Biol Chem. 292(2): 638-651.

- 94. Kaur H., Kumar C., Junot C., Toledano M.B., Bachhwat A.K. Dug1p is a Cys-Gly peptidase of the γ-glutamyl cycle of *Saccharomyces cerevisiae* and represents a novel family of Cys-Gly peptidases. (2009). Journal of Biological Chemistry. 284: 14493-14502.
- 95. Kelly B.S., Antholine W.E., Griffith O.W. (2002). *Escherichia coli* gammaglutamylcysteine synthetase. Two active site metal ions affect substrate and inhibitor binding. J Biol Chem. 277(1): 50-58.
- 96. Ketterer B. (1982). The role of nonenzymatic reactions of glutathione in xenobiotic metabolism. Drug Metab Rev. 13(1): 161-187.
- 97. Kimura R. and Murata T. (1986). Effect of theanine on norepinephrine and serotonin levels in rat brain. Chem Pharm Bull (Tokyo). 34(7): 3053-3057.
- Kinlough C.L., Poland P.A., Bruns J.B., Hughey R.P. (2005). Gammaglutamyltranspeptidase: disulfide bridges, propeptide cleavage, and activation in the endoplasmic reticulum. Methods Enzymol. 401: 426-449.
- 99. Kino K., Kuratsu S., Noguchi A., Kokubo M., Nakazawa Y., Arai T., Yagasaki M. and Kirimura K. (2007). Novel substrate specificity of glutathione synthesis enzymes from *Streptococcus agalactiae* and *Clostridium acetobutylicum*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 352 (2): 351–359.
- 100. Kistler M., Maier K., Eckardt-Schupp F. (1990). Genetic and biochemical analysis of glutathione-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Mutagenesis. 5: 39-44.
- 101. Klapheck S. (1988). Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. Physiol. Plant.74: 727–732.
- 102. Kobayashi K., Nagato Y., Aoi N., Juneja L.R., Kim R., Yamamoto R., Sugimoto S. (1998). Effect of L-theanine on release of α-brain waves in human volunteers. Journal of the agricultural chemical society of Japan. 72(2): 153-157.

- 103. Koivusalo M., Baumann M. and Uotila L. (1989). Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. FEBS Lett. 257: 105-109.
- 104. Kozak E.M. and Tate S.S. (1981). Glutathione-degrading Enzymes of Microvillus Membrane. The Journal of Biological Chemist. 257(11): 6322-6327.
- 105. Kumar S., Kaur A., Chattopadhyay B., Bachhawat A.K. (2015). Defining the cytosolic pathway of glutathione degradation in *Arabidopsis thaliana*: role of the Cha/GCG family of γ-glutamyl cyclotransferases as glutathione-degrading enzymes and AtLAP1 as the Cys-Gly peptidase. Biochemical Journal. 468: 73-85.
- 106. Kumar A. and Bachhawat A.K. (2012). Pyroglutamic acid throwing light on a lightly studied metabolite. Curr Sci. 102: 288.
- 107. Kumar A. and Bachhwat A.K. (2010). OXP1/YKL215c encodes an ATPdependent 5-oxoprolinase in Saccharomyces cerevisiae functional characterization, domain structure and identification of actin-like ATPbinding motifs in eukaryotic 5-oxoprolinases. FEMS yeast research 10: 394-401.
- 108. Kumar C., Sharma R., Achhawat A.K. (2003). Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of gamma-glutamyl transpeptidase in the yeast Saccharomyces cerevisiae: evidence for an alternative gluathione degradation pathway. FEMS Microbiol Lett. 219(2):187-94.
- 109. Kumar A., Tikoo S., Maity S., Shantanu S., Sagar S., Kaur A. (2012).
  Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as γ-glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. EMBO Rep. 13(12):1095-101. doi: 10.1038/embor.2012.156. Epub 2012 Oct 16.
- 110. Kumar A. and Bachhwat A.K. (2010). OXP1/YKL215c encodes an ATPdependent 5-oxoprolinase in *Saccharomyces cerevisiae*: functional characterization, domain structure and identification of actin-like ATP-

binding motifs in eukaryotic 5-oxoprolinases. FEMS yeast research. 10: 394-401.

- 111. Kung H.-F. and Wagner C. (1969). γ-Glutamylmethylamide: a new intermediate in the metabolism of methylamine. J. Biol. Chem. 244: 4136-4140.
- 112. Kuribara H. and Tadokoro S. (1982). An anticonflict effect of gamma-1-glutamyltaurine (Litoralon) in rats. Jpn J Pharmacol. 32(6): 1067-1074.
- 113. Kurihara S., Oda S., Kato K., Kim H.G., Koyanagi T., Kumagai H., Suzuki H. (2005). A novel putrescine utilization pathway involves gamma-glutamylated intermediates of *Escherichia coli* K-12. J Biol Chem. 280(6): 4602-4608.
- 114. Kurihara S., Oda S., Tsuboi Y., Kim H.G., Oshida M., Kumagai H., Suzuki H. (2008). gamma-Glutamylputrescine synthetase in the putrescine utilization pathway of *Escherichia coli* K-12. J Biol Chem. 283(29):19981-19990.
- 115. Kuroda M., Kato Y., Yamazaki J., Kai Y., Mizukoshi T., Miyano H. and Eto Y. (2012). Determination of γ-glutamyl-valyl-glycine in raw scallop and processed scallop products using high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Food Chemistry 134. 1640-1644.
- 116. Kuroda M., Kato Y., Yamazaki J., Kai Y., Mizukoshi T., Miyano H. and Eto Y. (2012). Determination and quantification of γ-glutamyl-valyl-glycine in commercial fish sauses. J Agric Food Chem. 60. 7291-7296.
- 117. Kuroda M., Kato Y., Yamazaki J., Kai Y., Mizukoshi T., Miyano H. and Eto Y. (2013). Determination and quantification of the *kokumi* peptide, γ-glutamyl-valyl-glycine, in commercial soy sauses. J Food Chemistry 141. 823-828.
- 118. Lancaster J.E., Shaw M.L. (1994). Characterization of purified gammaglutamyl transpeptidase in onions: evidence for in vivo role as peptidase. Phytochemistry. 36: 1351–1358.
- 119. Laperche Y., Bulle F., Aissani T., Chobert M.N., Aggerbeck M., Hanoune J., Guellaën G. (1989). Molecular cloning and nucleotide sequence of rat kidney

gamma-glutamyl transpeptidase cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 83(4): 937-941.

- 120. Larsson A., Orrenius S., Holmgren A. and Mannervik B. (1983). Function of GSH. Raven, New York. 1–75.
- 121. Levitch M.E. (1976). The demonstration of two descrete enzymes catalyzing the synthesis of glutamine and γ-glutamylmethylamide in *Pseudomonas* MS. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76(2): 609-614.
- 122. Li Y., Wei G., Chen J. (2004). Glutathione: a review on biotechnological production. Appl Microbiol Biotechnol. 66: 233 242.
- 123. Li H., Xu H. M., Graham D. E. and White R. H. (2003). Glutathione synthetase homologs encode alpha-L-glutamate ligases for methanogenic coenzyme F-420 and tetrahydrosarcinapterin biosyntheses. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.100: 9785–9790.
- 124. Lin M., Liu X., Xu Q., Song H., Li P. and Yao J. (2013). Aroma-active components of yeast extract pastes with a basic and characteristic meaty flavour. J Sci Food Agric 94: 882–889.
- 125. Liu R.M., Shi M.M., Giulivi C. and Forman H. J. (1998). Quinones increase gamma-glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells. Am. J. Physiol. 274: 330–336.
- 126. Llewellyn N.M., Li Y., Spencer J.B. (2007). Biosynthesis of butirosin: transfer and deprotection of the unique amino acid side chain. Chem Biol 14: 379–386.
- 127. Lu S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. Mol. Aspects Med. 30: 42–59.
- 128. Lum G., Gambino S.R., (1972). Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas, or bone, Clin Chem.; 18: 358–362.
- 129. Luperchio S., Tamir S., Tannenbaum S.R. (1996). NO-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. Free Radic Biol Med. 21(4): 513-509.

- 130. Marriott P. J., Eyres G. T., Dufour J.-P. (2009). Emerging opportunities for flavor analysis through hyphenated gas chromatography. J. Agric. Food Chem. 57: 9962 – 9971.
- 131. Markey C.M., Rudolph D.B., Labus J.C., Hinton B.T. (1998). Oxidative stress differentially regulates the expression of gamma-glutamyl transpeptidase mRNAs in the initial segment of the rat epididymis. J Androl. 19(1): 92-99.
- 132. Martin M.N., Slovin J.P. (2000) Purified gamma-glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. Plant Physiol. 122(4): 1417–1426.
- 133. Maruyama Y., Yasuda R., Kuroda M., Eto. (2012). *Kokumi* substances, enhancers of basic tastes, induce responses in calcium-sensing receptor expressing taste cells. *PLoS One*. 7(4): 1-8.
- 134. McIntyre T.M. and Curthoys N.P. (1979). Comparison of the hydrolytic and transfer activities of rat renal gamma-glutamyltranspeptidase. J Biol Chem. 254(14): 6499-6504.
- 135. McIntyre T. and Curthoys N.P. (1982). Renal Catabolism of Glutathione. The Journal of Biological Chemistry. 257(20): 11915-11921.
- 136. Meister A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. J Biol Chem. 263(33): 17205-17208.
- 137. Meister A. (1992). On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione.Biochem Pharmacol. 44(10): 1905-1915.
- 138. Meister A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals.J Biol Chem. 269(13): 9397-9400.
- 139. Meister A. and Anderson M.E. (1983). Glutathione. Annu. Rev. Biochem. 52: 711-760.
- 140. Meister A. and Tate S.S. (1976). Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. Annu Rev Biochem. 45: 559-604.
- 141. Mertens S., Gallone B., Steensels J., Herrera-Malaver B., Cortebeek J., Nolmans R., Saels V., Vyas V. K. and Verstrepen J. (2019). Reducing

phenolic off-flavors through CRISPR-based gene editing of the FDC1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces eubayanus* hybrid lager beer yeasts. PLoS ONE 14(1): e0209124.

- 142. Misicka A., Maszczynska I., Lipkowski A.W., Stropova D., Yamamura H.I., Hruby V.J. (1996). Synthesis and biological properties of gamma-glutamyldermorphin, a prodrug. Life Sci. 58(11): 905-911.
- 143. Miyaki T., Kawasaki H., Kuroda M., Miyamura N. and Kouda T. (2015). Effect of a *kokumi* peptide, γ-glutamyl-valyl-glycine, on the sensory characteristics of chicken consommé. Flavour 4: 17.
- 144. Miyamura N., Kuroda M., Kato Y., Yamazaki Y., Mizukoshi T., Miyano H.,
  Eto Y. (2014). Determination and quantification of a *kokumi* peptide,
  γ-glutamyl-valyl-glycine, in fermented shrimp paste condiments. Food Sci Tech Res. 20: 699-703.
- 145. Miyamura N., Iida Y., Kuroda M., Kato Y., Yamazaki Y., Mizukoshi T., Miyano H. (2015). Determination and quantification of a *kokumi* peptide, γ-glutamyl-valyl-glycine, in brewed alcoholic beverages. J Biosci Bioeng. 120(3): 311-314.
- 146. Molyneux R. J., Schieberle P. (2007). Compound identification: a Journal of Agricultural and Food Chemistry perspective. J. Agric. Food Chem. 55: 4625 – 4629.
- 147. Mooz E.D., Wigglesworth L. (1976). Evidence for the gamma-glutamyl cycle in yeast. Biochem Biophys Res Commun. 68(4): 1066-1072.
- 148. Morris C.J. and Thompson J.F. (1958). The detection, isolation, and identification of gamma-glutamyl-S-methylcysteine from beans. Arch Biochem Biophys. 73(1): 281-283.
- 149. Mungrue I.N., Pagnon J., Kohannim O., Gargalovic P.S., Lusis A.J. (2009). CHAC1/MGC4504 is anovel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. The Journal of Immunology. 182: 466-476.

- 150. Nagodawithana T. (1992). Yeast-derived flavors and flavor enhancers and theirprobable mode of action. Food Technol. 46:140–142, 144.
- 151. Nagodawithana T.W. (1994). Savory flavors, in Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients. Wiley, New York, pp. 135–168.
- 152. Nakayama R., Kumagai H., Tochikura T. (1984). Purification and properties of gamma-glutamyltranspeptidase from *Proteus mirabilis*. J Bacteriol 160: 341–346.
- 153. Nakayama R., Nidehiko K., Maruyama T., Tochikura T., Ueno T., Fukami H. (1981). Synthesis of γ-Glutamylpeptides by γ-Glutamylcysteine Synthetase from *Proteus mirabilis*. Agric. Biol. Chem. 45 (12): 2839-2845.
- 154. Nishimura A., Ozaki Y., Oyama H., Shin T. and Murao S. (1998). Purification and Characterization of a Novel 5-Oxoprolinase (without ATP-Hydrolyzing Activity) from *Alcaligenes faecalis* N-38A. Applied and Environmental Microbiology. 65(2): 712–717.
- 155. Nishiuchi H., Hoshino W., Yamazaki J., Mizukoshi T., Serebryanyy V.A., Sofyanovich O.A., et al, Inventor; Ajinomoto Co., Inc., Assignee. A yeast extract containing γ-Glu-X OR γ-Glu-X-Gly and a method for producing the same. WO Application WO2011129462 A2. 2010 April 12.
- 156. Nishiuchi H., Suehiro M., Sugimoto R., Yamagishi K. (2013). Preparation of a γ-glutamylcysteine-enriched yeast extract from a newly developed GSH2-deficient strain. Biosci. Bioeng.115(1): 50-4.
- 157. Nitanai Y., Satow Y., Adachi H. and Tsujimoto M. (2002). Crystal Structure of Human Renal Dipeptidase Involved in b-Lactam Hydrolysis. J. Mol. Biol. 321: 177–184.
- 158. Noiva R. and Lennarz W. J. (1992). Protein disulfide isomerase. J. Biol. Chem. 267: 3553–3556.
- 159. Oakley A.J., Coggan M. and Board P.G. (2008). Identification and Characterization of  $\gamma$ -Glutamylamine Cyclotransferase, an Enzyme Responsible for  $\gamma$ -Glutamyl- $\epsilon$ -lysine Catabolism. Journal of Biological Chemistry. 285: 9642-9648.

- 160. Oakley A.J., Yamada T., Liu D., Coggan M., Clark A.G., Board P.G. (2008) The identification and structural characterization of C7orf24 as gammaglutamyl cyclotransferase. An essential enzyme in the gammaglutamyl cycle. J Biol Chem 283: 22031–22042.
- 161. Ohkama-Ohtsu N., Oikawa A., Zhao P., Xiang C., Saito K., and Oliver D.J. (2008). A γ-Glutamyl Transpeptidase-Independent Pathway of Glutathione Catabolism to Glutamate via 5-Oxoproline in Arabidopsis. Plant Physiol. 148(3): 1603–1613.
- 162. Ohkama-Ohtsu N., Radwan S., Peterson A., Zhao P., Badr A.F., Xiang C., Oliver D.J. (2007a) Characterization of the extracellular γ-glutamyl transpeptidases GGT1 and GGT2 in *Arabidopsis*. Plant J 49: 865–877.
- 163. Ohkama-Ohtsu N., Zhao P., Xiang C., Oliver D.J. (2007b) Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by γ-glutamyl transpeptidase GGT3 in *Arabidopsis*. Plant J 49: 878–888.
- 164. Ohsu T., Amino Y., Nagasaki H., Yamanaka T., Takeshita S., Hatanaka T., Maruyama Y., Miyamura N., Eto Y. (2010). Involvement of the calciumsensing receptor in human taste perception. J Biol Chem. 285(2): 1016-1022.
- 165. Ogawa Y., Sugiura D., Motai H., Yuasa K., Tahara Y. (1997). DNA sequence of *Bacillus subtilis* (natto) NR-1 gamma-glutamyltranspeptidase gene, ggt. Biosci Biotechnol Biochem. 61(9): 1596-600.
- 166. Okada T., Suzuki H., Wada K., Kumagai H., Fukuyama K. (2006). Crystal structures of gamma-glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(17): 6471-6476.
- 167. Ohtake Y. and Yabuuchi S. (1991). Molecular cloning of the gammaglutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 7(9): 953-961.
- 168. van den Oord A.H. and van Wassenaar P.D. (1997). Umami peptides: assessment of their alleged taste properties. Z Lebensm-Unters-Forsch A. 205:125–130.

- 169. Oppenheimer L., Wellner V.P., Griffith O.W. and Meister A. (1979). Glutathione synthetase. Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites. J Biol Chem. 254: 5184–5190.
- 170. Orlowski M. and Meister A. (1970). The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. Proc Natl Acad Sci U S A. 67(3): 1248-1255.
- 171. Orlowski M. and Meister A. (1971). Isolation of highly purified  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase from rat kidney. Biochemistry. 10: 372-380.
- 172. Orlowski M. and Meister A. (1971). Partial reactions catalyzed by gammaglutamylcysteine synthetase and evidence for an activated glutamate intermediate. J. Biol. Chem. 246: 7095–7105.
- 173. Orlowski M. and Meister A. (1973). Isolation of highly purified  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase from rat kidney. Biochemistry. 10: 372-380.
- 174. Orlowski M., Richman P.G and Meister A. (1969). Isolation and properties of  $\gamma$ -L-glutamylcyclotransferase from human brain. Biochemistry. 8: 1048-1055.
- 175. Orlowski M. and Wilk S. (1978). Synthesis of ophthalmic acid in liver and kidney *in vivo*. Biochem J. 170(2): 415-419.
- 176. Orning L., Hammarström S., Samuelsson B. (1980). Leukotriene D: a slow reacting substance from rat basophilic leukemia cells. Proc Natl Acad Sci USA.77(4): 207-214.
- 177. Orellana C. (2002). Immune system stimulator shows promise against tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2: 711.
- 178. Pallardó F.V., Markovic J., García J.L., Viña J. (2009). Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. Mol Aspects Med. 30(1-2): 77-85.
- 179. Papandrikopoulou A., Frey A., Gassen H.G. (1989). Cloning and expression of gamma-glutamyl transpeptidase from isolated porcine brain capillaries. Eur J Biochem. 183(3): 693-698.

- 180. Pattanayak V., Lin S., Guilinger J.P., Ma E., Doudna J.A., Liu D.R. (2013).High-throughput profiling of off-target DNA cleavage revealsRNAprogrammed Cas9 nuclease specificity. Nat. Biotechnol. 31(9): 839-843.
- 181. Paulose B., Chhikara S., Coomey J., Jung H.-I., Vatamaniuk O., Dhankher O.P. A γ-glutamyl cyclotransferase protects *Arabidopsis* plants from heavy metal toxicity by recycling glutamate to maintain glutathione homeostasis. The Plant Cell. 25: 4580-4595.
- 182. Peltier J.-B., Cai Y., Sun, Q., Zabrouskov V., Giacomelli L.,Rudella A., Ytterberg A.J., Rutschow H. and van Wijk K.J. (2006). The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana*. Chloroplasts. Mol. Cell. Proteomics. 5: 114–133.
- 183. Penninckx M.J. and Elskens M.T. (1993). Metabolism and Functions of Glutathione in Micro-organisms. Advances in Microbial Physiology. Vol.34.
- 184. Petit JF, Nicaise M, Lepoivre M, Guissani A, Lemaire G. (1996). Protection by glutathione against the antiproliferative effects of nitric oxide. Dependence on kinetics of no release. Biochem Pharmacol. 52(2): 205-212.
- 185. Polekhina G., Board P.G., Gali R.R., Rossjohn J., Parker M.W. (1999). Molecular basis of glutathione synthetase deficiency and a rare gene permutation event. EMBO J. 18(12): 3204-3213.
- 186. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A and Zhang F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc. 8(11): 2281–2308.
- 187. Rathbun W.B. (1967b). γ-Glutamyl-cysteine synthetase from bovine lens. II. Cysteine analogue studies. Arch. Biochem. Biophys. 122: 73-84.
- 188. Reichelt K.L. (1970). The isolation of gamma-glutamyl peptides from monkey brain. J Neurochem. 17(1): 19-25.
- 189. Richman P.G. and Meister A. (1975). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. J. Biol. Chem. 250: 1422–1426.

- 190. Rinderknecht H., Thomas D. and Aslin S. (1958). γ-Glutamyl-S-methylcystein und andere Peptide in der Mondbohne (*Phaseolus lunatus L*.).
  Helvetica Chimica Acta. 41(1): 1–11.
- 191. Ristoff E. and Larsson A. (2007). Inborn errors in the metabolism of glutathione. Orphanet J Rare Dis. 2: 16.
- 192. Romanoski C.E., Che N., Yin F., Pouldar D., Civelek M., Pan C., Lee S., Vakili L., Yang W.-P. (2011). Network for Activation of Human Endothelial Cells by Oxidized Phospholipids A Critical Role of Heme Oxygenase 1. Circulation research. 109: e27-e41.
- 193. Rosalki S.B., Rau D. (1972). Serum γ-glutamyl transpeptidase activity in alcoholism. Clin Chim Acta. 39(1): 41-47.
- 194. Rosalki S.B. Gamma-glutamyl transpeptidase. (1975). Adv Clin Chem. 17: 53-107.
- 195. Rothstein R. (1991). Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. Methods Enzymol. 194: 281 301.
- 196. Sakato Y. (1949). Studies on the chemical constituents of tea. Part III. On a new amide theanine. Nippon Nogeikagaku Kaishi 23: 262–267.
- 197. Sambrook J., Russell D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual.,
   3<sup>rd</sup> edn. // Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York.
- 198. Schlichtherle-Cerny H. and Grosch W. (1998). Evaluation of taste compounds of stewed beef juice. Z Lebensm-Unters-Forsch A. 207: 369–376.
- 199. Schwarz B. and Hofmann T. (2007). Sensory-guided decomposition of red currant juice (Ribes rubrum) and structure determination of key astringent compounds. J Agric Food Chem. 55:1394–1404.
- 200. Sekura R. and Meister A. (1977). γ-Glutamylcysteine synthetase: Further purification, "half of the sites" reactivity, subunits, and specifity. J Biol Chem. 252(8): 2599-2605.
- 201. Selvik L.-K.M., Fjeldbo C.S., Flanberg A., Steigedal T.S., Misund K., Anderssen E., Doseth B., Langaas M., Tripathi S., Beisvag V. (2013). The

duration of gastrin treatment affects global gene expression and molecular responses involved in ER stress and anti-apoptosis. BMC genomics. 14: 1.

- 202. Sen C.A and Packer L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. FASEB J. 10(7): 709-720.
- 203. Sherman F. Getting started with yeast. Methods in Enzymology. (2002). 350: 3–41.
- 204. Sies H. (1985). Oxidative stress. Academic Press, London. pp. 1-8
- 205. Sies H. (1993). Strategies of antioxidant defense. Eur. J. Biochem. 215: 213-219.
- 206. Sikorski R.S and Boeke J.D. (1991). In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. Methods Enzymol. 194: 302 – 318.
- 207. Simbirtsev A., Kolobov A., Zabolotnych N., Pigareva N., KonusovaV., Kotov A., Variouchina E., Bokovanov V., Vinogradova T., Vasilieva S., Tuthill C. (2003). Biological activity of peptide SCV-07 against murine tuberculosis. Russ J Immunol. 8: 11–22.
- 208. Skipsey M., Davis B.G. and Edwards R. (2005). Diversification in substrate usage by glutathione synthetases from soya bean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*). Biochem J. 391(3): 567-74.
- 209. Smith T. F., Gaitatzes C., Saxena K. and Neer E. J. (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. Trends Biochem. Sci. 24: 181–185.
- 210. Snoke J.E. (1955). Isolation and properties of yeast glutathione synthetase. Journal of Biological Chemistry. 213: 813-824.
- 211. Soga T., Baran R., Suematsu M., Ueno Y., Ikeda S., Sakurakawa T., Kakazu Y., Ishikawa T., Robert M., Nishioka T., Tomita M. (2006). Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. J Biol Chem. 281(24): 16768-16776.

- 212. Soltaninassab S. R., Sekhar K. R., Meredith M. J., Freeman M. L. (2000).
  Multifaceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. J. Cell Physiol. 182: 163–170.
- 213. Sontheimer E.J. and Barrangou R. (2015). The Bacterial Origins of the CRISPR Genome-Editing Revolution. Hum Gene Ther. 26(7): 413-24.
- 214. Spector D., Labarre J., Toledano M.B. (2001). A genetic investigation of the essential role of glutathione: mutations in the proline biosynthesis pathway are the only suppressors of glutathione auxotrophy in yeast. J Biol Chem. 276(10): 7011-7006.
- 215. Spitzmüller Z., Hajdú M., Pócsi I., Emri T. (2015). Degradation of glutathione in Aspergillus nidulans – Short communication. Acta Biologica Hungarica. 66: 242-245.
- 216. Springael J.Y., Penninckx M.J. (2003). Nitrogen-source regulation of yeast gamma-glutamyl transpeptidase synthesis involves the regulatory network including the GATA zinc-finger factors Gln3, Nil1/Gat1 and Gzf3. Biochem J. 371(Pt 2): 589-595.
- 217. Stanbrough M., Rowen D. W. and Magasanik B. (1995). Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 9450-9454.
- 218. Steensels J., Snoek T., Meersman E., Nicolino M.P., Voordeckers K. and Verstrepen K.J. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. FEMS Microbiol Rev 38: 947–995.
- 219. Stein C. and Weinreich D. (1982). An In Vitro Characterization of γ-Glutamylhistamine Synthetase: A Novel Enzyme Catalyzing Histamine Metabolism in the Central Nervous System of the Marine Mollusk, *Aplysia californica*. J Neurochem. 38(1): 204-214.
- 220. Stephen D.W. and Jamieson D.J. (1997). Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae GSH1* gene by hydrogen peroxide. Mol Microbiol 23(2):203-210.

- 221. Sugiyama K., Izawa S. and Inoue Y. (2000). The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 275(20): 15535-15540.
- 222. Suzuki H., Kumagai H. and Tochikura T. (1986). γ-Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12: purification and properties. J Bacteriol. 168(3): 1325–1331.
- 223. Suzuki H., Kumagai H., Echiqo T. and Tochikura T. (1989). DNA sequence of the Escherichia coli K-12 gamma-glutamyltranspeptidase gene, ggt. J Bacteriol. 171(9): 5169-5172.
- 224. Suzuki H, Kumagai H. (2002). Autocatalytic processing of gammaglutamyltranspeptidase. J Biol Chem. 277(45): 43536-43543.
- 225. Suzuki H., Yamada C. and Kato K. (2007). γ-Glutamyl compounds and their enzymatic production using bacterial g-glutamyltranspeptidase. Amino Acids. 32(3): 333-340.
- 226. Tang C., Lan D., Zhang H., Ma J., Yue H. (2013). Transcriptome analysis of duck liver and identification of differentially expressed transcripts in response to duck liver hepatitis A virus genotype C infection. Plos one. 8: e71051.
- 227. Taniguchi N. and Ikeda Y. (1998). gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 72: 239-278.
- 228. Tate S.S. (1975). Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with S-acyl derivatives of glutathione. FEMS Lett. 54(3): 319-322.
- 229. Tate S.S. and Meister A. (1976). Affinity labeling of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and location of the  $\gamma$ -glutamyl binding site on the light subunit. Proc. Natl. Acad. Sc. USA. 74(3): 931-935.
- 230. Tate S.S. and Meister A. (1981). gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. Mol Cell Biochem. 39: 357-368.
- 231. Tattoli I., Sorbana M.T., Vuckovic D., Ling A., Soares F., Carneiro L.A., Yang C., Emili A., Philpott D.J., Girardin S.E. (2012). Amino acid starvation

program induced by invasive bacterial pathogens triggers an innate host defense program. Cell host & microbe. 11: 563-575.

- 232. Toelstede S., Dunkel A., Hofmann T. (2009). A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured Gouda cheese. J Agric Food Chem. 57(4): 1440-1448.
- 233. Thomson G.A. and Meister A. (1977). Interrelationships between the binding sites for amino acids, dipeptides and gamma-glutamyl donors in gammaglutamyl transpeptidase. J Biol Chem. 252(19): 6792-6798.
- 234. Thomson G.A. and Meister A. (1979). Modulation of the hydrolysis, transfer, and glutaminase activities of gamma-glutamyl transpeptidase by maleate bound at the cysteinylglycine binding site of the enzyme. J Biol Chem. 254(8): 2956-2960.
- 235. Townsend D.M., Tew K.D. and Tapiero H. (2003). Biomedicine & Pharmacotherapy. 57: 145–155.
- 236. Tsuchiya K., Mulcahy R.T, Reid L.L, Disteche C.M, Kavanagh T.J. (1995). Mapping of the glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene (GLCLC) to human chromosome 6p12 and mouse chromosome 9D-E and of the regulatory subunit gene (GLCLR) to human chromosome 1p21-p22 and mouse chromosome 3H1-3. Genomics. 30: 630–632.
- 237. Turner G.C., Du F. and Varshavsky A. (2000). Peptides accelerate their uptake by activating a ubiquitin-dependent proteolytic pathway. Nature 405(6786): 579-83.
- 238. Ueda Y., Sakaguchi M., Hirayama K., Miyajima R., Kimizuka A. (1990). Characteristic flavour constituents in water extract of garlic. Agric. Biol. Chem. 54: 163-169.
- 239. Vanderlaan M., Phares W. (1981). gamma-Glutamyltranspeptidase: a tumour cell marker with a pharmacological function. Histochem J. 13(5): 865-877.
- 240. Veeravalli K., Boyd D., Iverson B.L., Beckwith J., Georgiou G. (2011). Laboratory evolution of glutathione biosynthesis reveals natural compensatory pathways. Nat Chem Biol. 7(2):101-105.

- 241. Velisek J., Davidek J., Kubelka V., Tran T.B.T. and Hajslova J. (1978).
  Succinic acid in yeast autolysates and its sensory properties. Nahrung 22: 735–743.
- 242. Vergauwen B., Vos D.D. and Van Beeumen J.J. (2006). Characterization of the bifunctional γ-glutamate-cysteine ligase/glutathione synthetase (GshF) of Pasteurella *multocida*. J. Biol. Chem. 281: 4380–4394.
- 243. Vigentini I., Gebbia M., Belotti A., Foschino R. and Roth F.P. (2017). CRISPR/Cas9 System as a Valuable Genome Editing Tool for Wine Yeasts with Application to Decrease Urea Production. Frontiers in Microbiology. Vol.8. Article 2194.
- 244. Viña J.R., Palacin M., Puertes I.R., Hernandez R., Viña J. (1989). Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation. Am J Physiol. 257(6 Pt 1): E916-922.
- 245. Virtanen A.I. and Matikkala E.J. (1960). New gamma-glutamyl peptides in the onion (*Allium cepa*). Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 322: 8-20.
- 246. Vuong Q.V., Boyer M.C. and Roach P.D. (2011). L-Theanine: properties, synthesis and isolation from tea. J Sci Food Agric. 91: 1931–1939.
- 247. Waley S.G. (1956). Acidic peptides of the lens. Biochem J. 64(4): 715-726.
- 248. Wan X., Zhang Z. and Li D. (2009). Chemistry and biological properties of theanine. Tea and Tea Products. Chemistry and Health-Promoting Properties. Ed. by Ho CT, Lin JK and Shahidi F. Pp. 255–274.
- 249. Wang W., Ballatori N. (1998). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. Pharmacol Rev. 50(3): 335-356.
- 250. Wang M., Sun J., Xue F., Shang F., Wang Z., Tan T. (2012). The effect of intracellular amino acids on GSH production by high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Biochem Biotechnol. 168(1):198-205.
- 251. Wannamethee G., Ebrahim S., Shaper A.G. (1995). Gammaglutamyltransferase: determinants and association with mortality from ischemic heart disease and all causes. Am J Epidemiol. 142(7): 699-708.

- 252. Wheeler G.L., Quinn K.A., Perrone G., Dawes I.W. and Grant C.M. (2002).
  Glutathione regulates the expression of γ-glutamylcysteine synthetase via the Met4 transcription factor. Molecular Microbiology. 2: 545–556.
- 253. Whitfield J. B. (2001). Gamma-glutamyl transferase. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38: 263–355.
- 254. Wickham S., West M.B., Cook P.F. and Hanigan M.H. (2013). Novel Insights into Eucaryotic γ-Glutamyltranspeptidase 1 from the Crystal Structure of the Glutamate-bound Human enzyme. Journal of Biological Chemistry. 288: 31902-31913.
- 255. Wilkinson R. and Wiedenheft B. (2014). A CRISPR method for genome engineering. F1000Prime Rep v.6: 3.
- 256. Woodlock T.J, Brown R., Mani M., Pompeo L., Hoffman H., Segel G. B. and Silber R. (1990). Decreased L system amino acid transport and decreased gamma-glutamyl transpeptidase are independent processes in human chronic lymphocytic leukemia B-lymphocytes. Journal of cellular physiology 145: 217-221.
- 257. Wu A.L. and Moye-Rowley W.S. (1991). *GSH1*, which encodes gammaglutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. Mol Cell Biol 14(9): 5832-5839.
- 258. Xaplanteri M.A., Petropoulos A.D., Dinos G.P., Kalpaxis D.L. (2005). Localization of spermine binding sites in 23S rRNA by photoaffinity labeling: parsing the spermine contribution to ribosomal 50S subunit functions. Nucleic Acids Res. 33(9): 2792-2805.
- 259. Yamamoto S., Morihara Y., Wakayama M., Tachiki T. (2008). Theanine production by coupled fermentation with energy transfer using gamma-glutamylmethylamide synthetase of *Methylovorus mays* No. 9. Biosci Biotechnol Biochem. 72(5): 1206-1211.
- 260. Yamamoto S., Wakayama M., Tachiki T. (2005). Theanine production by coupled fermentation with energy transfer employing *Pseudomonas*

*taetrolens* Y-30 glutamine synthetase and baker's yeast cells. Biosci Biotechnol Biochem. 69(4): 784-789.

- 261. Yamashita K., Hitoi A., Taniguchi N., Yokosawa N., Tsukada Y., Kobata A. (1983). Comparative study of the sugar chains of gamma-glutamyltranspeptidases purified from rat liver and rat AH-66 hepatoma cells. Cancer Res. 43(11): 5059-5063.
- 262. Yamashita K., Hitoi A., Tateishi N., Higashi T., Sakamoto Y., Kobata A. (1983). Organ-specific difference in the sugar chains of gamma-glutamyltranspeptidase. Arch Biochem Biophys. 225(2): 993-996.
- 263. Yamashita K., Tachibana Y., Hitoi A., Matsuda Y., Tsuji A., Katunuma N., Kobata A. (1983). Difference in the sugar chains of two subunits and of isozymic forms of rat kidney gamma-glutamyltranspeptidase. Arch Biochem Biophys. 227(1): 225-232.
- 264. Yang Y., Chen Y., Johansson E., Schneider S.N., Shertzer H.G., Nebert D.W., Dalton T.P. (2007). Interaction between the catalytic and modifier subunits of glutamate-cysteine ligase. Biochem. Pharmacol. 74(2): 372–381.
- 265. Yokogoshi H., Kato Y., Sagesaka Y.M., Takihara-Matsuura T., Kakuda T., Takeuchi N. (1995). Reduction effect of theanine on blood pressure and brain 5-hydroxyindoles in spontaneously hypertensive rats. Biosci Biotechnol Biochem. 59(4): 615-618.
- 266. Yokogoshi H, Kobayashi M, Mochizuki M, Terashima T. (1998). Effect of theanine, r-glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats. Neurochem Res. 23(5): 667-673.
- 267. Zhang W., Li H., Cheng G., Hu S., Li Z., Bi D. (2008). Avian influenza virus infection induces differential expression of genes in chicken kidney. Research in veterinary science. 84: 374-381.
- 268. Zhang H., Forman H.J., Choi J. (2005). Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. Methods Enzymol. 401: 468-483.